

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Dr. Fúzi Márta

**A fluvastatin hatása a patkány vázizom funkcióra-
hypercholesterinaemiás állatmodell használata.**

DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2021.

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**A fluvastatin hatása a patkány vázizom funkcióra-
hypercholesterinaemiás állatmodell használata.**

Dr. Fúzi Márta

Témavezetők: Dr. Csernoch László, Dr. Paragh György



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2021.

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	5
I. Bevezetés és irodalmi áttekintés	7
1. A vázizom	7
A myogenezis mikroszkópos morfológiája.....	7
A vázizomszövet felépítése, működése.....	8
A vázizom-összehúzódnás mechanizmusa.....	10
A vázizomrostok típusai.....	10
Az elektromechanikai kapcsolat (ECC)	11
A dihidropiridin-receptor (Cav1.1)	12
A rianodin receptor.....	13
A RyR szabályozása.....	14
2. A kalcium jelátvittele	15
Az elemi kalcium-felszabadulási események.....	16
Az elemi kalcium-felszabadulási események fajtái.....	17
3. A koleszterin	18
A koleszterin	20
4. A statinok	23
A statinok szerkezete, hatásmechanizmusa.....	24
A statinok atheroscleotikus eredetű szív-érrendszeri megbetegedés kialakulását csökkentő hatása – alkalmazási előirat	25
A statinok pleiotrop hatása	26
A statinok mellékhatásai, myopátia	27
A statin miopátia patomechanizmusa: lehetséges teóriák:.....	29
5. Koenzim Q10:	32
A koenzim Q10 szerepe a statin-miopátiában:.....	32
II. Célkitűzések.....	34
III. Anyagok és módszerek.....	35
1. Állatmodell.....	35
A kezelés menete.....	35
A hyperkoleszterinaemiás állatmodell	36
A kezelésre használt gyógyszerek dózisa.....	37
A kezelés leteltét követő protokoll.....	38
2. Primer vázizom sejt-kultúra	39
3. Sejtproliferáció és -differentiáció vizsgálata	40
4. A lipidek és a kreatin-kináz enzim vizsgálata a vérérumban.....	41
5. Patológiai, szövettani vizsgálatok	41
6. Az izmok kontrakciós erejének vizsgálata	42
7. Izolált vázizomrostok preparálása	44
8. Nyugalmi intracelluláris kalcium-koncentráció meghatározása	45
9. Elemi kalcium-felszabadulási események detektálása	47
10. Statisztikai analízis	51
IV. Eredmények	53
1. A statin-kezelés hatása a primer vázizom sejt-kultúrára	53
Általános, morfológiai megfigyelések	53
A részletes, mennyiségi elemzés eredményei	54
2. Anatómiai eredmények	56
3. A szérumban lipidek és a kreatin-kináz enzim meghatározásának eredményei	59
4. Az intracelluláris nyugalmi kalcium-koncentráció meghatározásának eredményei	61

5. Az izomeró vizsgálatának eredményei.....	62
6. Az elemi kalcium-felszabadulási események vizsgálatának eredményei	69
V. Diskusszió, következtetések	77
1. Állatmodell.....	77
2. Myopathia.....	78
3. Elemi események.....	80
Összefoglalás.....	83
Summary	84
Irodalomjegyzék.....	85
Ábrajegyzék	99
Köszönetnyilvánítás	101

Rövidítések jegyzéke

ADP: adenzin difoszfát

AMP: adenzin monofoszfát

ATP: adenzin trifoszfát

cAMP: ciklikus AMP

CK: kreatin kináz

CLSM: konfokális lézer pásztázó mikroszkóp (*Confocal Laser Scanning Microscope*)

CoQ10: koenzim Q10 (ubiquinon)

CRU: kalcium-felszabadító egység (*Calcium Release Unit*)

DHPR: dihidropiridin receptor

DMEM: *Dubecco's Modified Eagle's Medium*

ECRE: elemi kalcium-felszabadulási esemény (*Elementary Calcium Release Event*)

EDL: *m. extensor digitorum longus*

ER: endoplazmás retikulum

ESC: Európai Kardiológiai Társaság (*European Society of Cardiology*)

FBS: (*fetal bovin serum*)

FDB: *m. flexor digitorum brevis*

FTHM: időbeli félérték szélesség (*full time at half maximum*)

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

GTP: guanozin trifoszfát

HC: hypercholesterinaemiás kezelési csoport

HC+S: hypercholesterinaemiás és fluvastatin kezelési csoport

HC+S+Q10: hypercholesterinaemiás és fluvastatin és koenzim Q10 kezelési csoport

HDL: nagy sűrűségű lipoprotein (*high-density lipoprotein*)

HMG-CoA-reduktáz: 3-hydroxy-3-methylglutaryl-koenzim A reduktáz

K: kontroll csoport

LDL: kis sűrűségű lipoprotein (*Low Density Lipoprotein*)

MDSC: izomfejlődés irányában elköteleződött őssejt (*Muscle-Derived Stem Cell*)

MHC: miozin nehéz lánc (*myozin heavy chain*)

MHC-II: Fő hisztokompatibilitási komplex II. (*Major Histocompatibility Complex II*)

MLC: miozin könnyű lánc (*myosin light chain*)

mtsa/mtsai: munkatársa/munkatársai

NADPH: nikotinamid-adenin-dinukleotid foszfát (redukált forma)

nTyr: normál HEPES-Tyrode oldat

PGC1 α : PPAR γ 1 α koaktivátora

PPAR γ : peroxiszóma proliferátor-aktiválta receptor γ

Q10: koenzim Q10 kezelési csoport

RCT: (*Randomised Controlled Trial*) randomizált kontrollált vizsgálat

ROS: reaktív oxigén-gyökök (*Reactive Oxygen Species*)

RyR: Ryanodin Receptor

S: fluvastatin kezelési csoport

S+Q10: fluvastatin és koenzim Q10 kezelési csoport

SAMS: statin-szedéshez társítható izomtünetek (*Statin-Associated Muscle Symptoms*)

SERCA: sarco- endoplazmaticus reticulum Ca²⁺ – ATP-áz

Sol: *m. soleus*

SR: sarcoplazmaticus reticulum

Statin: 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitor

TTP: csúcs eléréséhez szükséges idő (*time to peak*)

TU: tiouracyl kezelési csoport (HC kezeléshez kontroll)

I. Bevezetés és irodalmi áttekintés

Az érlelmeszesedés szövődményei és a háttérben álló emelkedett koleszterin-szint vezet a világ halálozási statisztikáit és a trend egyre növekvő tendenciát mutat. (*www.who.int*) 2000 - 2012 között globálisan 1 millióval nőtt a stroke miatti halálozás és majdnem másfél millióval nőtt az ischaemiás szívbetegség miatti halálozás. A hypercholesterinaemia kezelésére statin szedők száma jelentős és egyre nő. Azonban a kezelt populáció nagy hányada nem tudja tolerálni a gyógyszer szedését a vázizmot érintő mellékhatás miatt, így elesik a gyógyszer szív- érrendszeri halálozás rizikóját csökkentő protektív hatásától. A statin-szedés mellett jelentkező izomfájdalmak vagy gyengeség kialakulásának pontos oka kutatások tárgyát képezi világszerte, de egyelőre nem tisztázott.

1. A vázizom

A vázizom összehúzódásra specializálódott szövet, mely a hely- és helyzetváltoztatásban játszik elsősorban szerepet. Az összehúzódás során kémiai energiát (ATP, glikogén, glükóz) mechanikai energiává alakít át, ezzel biztosítja a test és a belső zsigeri szervek aktív mozgásait. Működése során hőt termel, így jelentős szerepe van a hőszabályozásban.

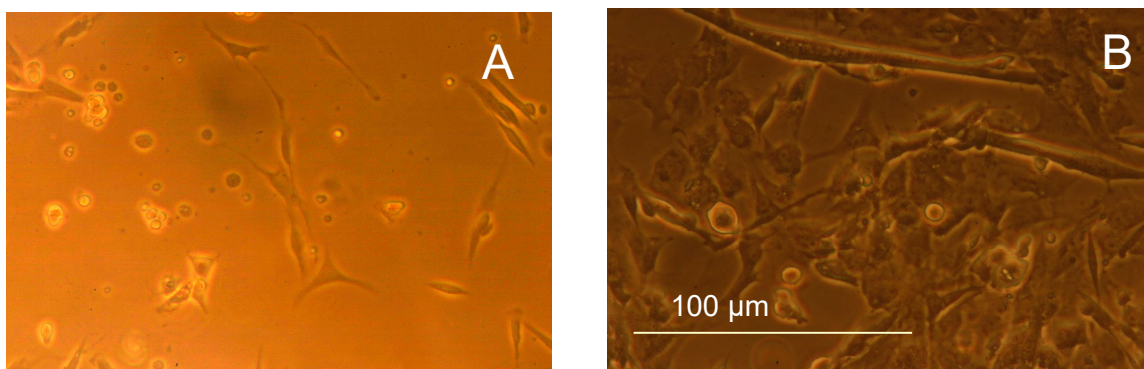
Fejlődéstanilag a középső csíralemez (mezoderma) származéka, mesenchyma-sejtek alkotják. A multipotens prekursor sejtek myoblast irányba determinálódnak, és myotubulusokká fuzionálnak. Az így kialakuló izomrostok többmagvú óriássejtek (1. ábra).

Az izomrostok kialakulása nem zárul le a magzati korban, a postnatalis életben is képződik de novo vázizomrost a növekedés során gyermekkorban, vagy izomsérülést követően felnőttkorban is. A regenerációban a rostok lamina basalis alatt elhelyezkedő prekursor sejtek vesznek részt: a pluripotens, izomfejlődés irányában elköteleződött őssejt MDSC-k (*Muscle-Derived Stem Cell*) vagy a szatellita sejtek. Izomkárosodás esetén a nyugvó sejtek aktiválódnak és differenciálódnak. (*Mauro 1961, Seale és mtsai 2000, Qu-Petersen és mtsai 2002, Buckingham és mtsai 2003*)

A myogenezis mikroszkópos morfológiája

A myogenezis morfológiáját primer tenyészetből származó szatellita sejtek vagy immortalizált myoblast sejtvonalak tenyésztése során figyelhetjük meg. A myoblastok orsó

alakúak, fibroblasthoz hasonló megjelenésűek nagy sejtmaggal és jól látható nucleolussal. A myoblastok fúziójával elongált, cilindrikus, sokmagvú izomsövek jönnek létre: a myotubulusok. A myotubulusok körül membrana basalis alakul ki, de ekkor a sejtmagok még centrálisak. A kontraktilis fehérjék is megjelennek és kötegekbe rendeződnek. A myotubulusok egyre több myoblasttal fuzionálnak és egyre több myofibrillum szintetizálódik az óriássejten belül: így jön létre a több tucat sejtmaggal rendelkező izomrost. Jellemzője, hogy a magok a perifériára szorúlnak, és a myofibrillumok sarcomerákba rendeződnek, amik fénymikroszkóposan harántcsíkolat képében is láthatóak. A párhuzamos lefutású izomrostok kialakulása jelenti a vázizom-differenciálódás végállapotát (1. ábra).



1. ábra. A myogenezis. *A: 24 óra tenyésztést követően látható szatellita sejtek és myoblastok. B: 72 óra tenyésztést követően többmagvú myotubulusok is megfigyelhetők. (saját anyag)*

A vázizomszövet felépítése, működése

Az izmokat egy kötőszövetes tok borítja: a fascia. Az izomszövet izomrostokból épül fel, amiket szintén kötőszövet határol. Az izomrostok sejtplazmája a sarcoplazma, amit elsősorban izomfibrillumok töltenek ki, emellett glikogén és vörös színű, oxigént tároló mioglobin is található benne. Az izomfibrillumok izomfilamentumokból állnak. Az izomfilamentumok három típusa a vastag filamentum, ami miozinból áll; a vékony filamentum, ami döntően aktinből tevődik össze és az elasztikus filamentum, amit titin alkot.

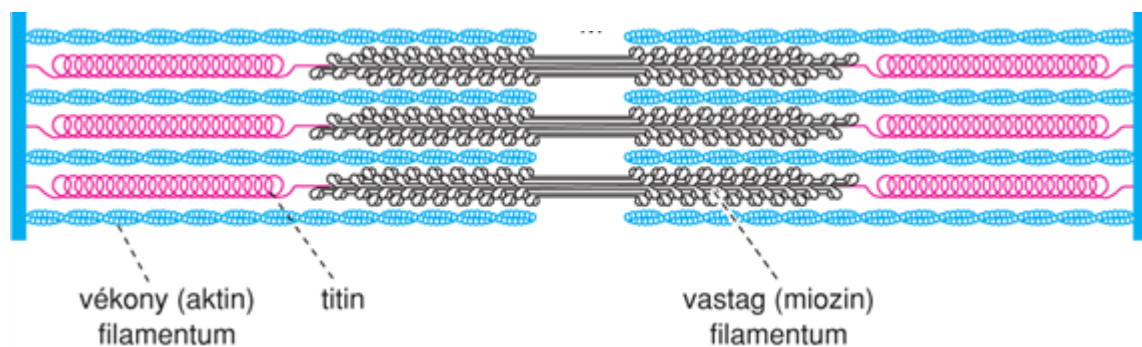
A vázizmok működésében alapvető szerepe van a *miozin*nak. A miozin (220 kDa) az ATP-dependens motoros fehérjék családjába tartozik, melyek közös jellemzője, hogy aktint kötnek, ATP-t hidrolizálnak és erőt generálnak. Két nehézláncból (MHC) és négy könnyű láncból (MLC) áll. A nehéz lánc és az f-aktin kötődése a miozin ATP-áz aktivitásának aktivátora. A miozin molekulák a farki részüknél helikálisan kapcsolódnak össze, kb. 200 molekulából áll össze egy *vastag filamentum* (2. ábra). (Aguilar és mtsa 2010)

Az *aktin* egy 42 kDa tömegű globuláris fehérje. A vázizomban lineáris polimerek formájában alkotja a *vékony filamentumot*: két aktin-lánc egymással helikálisan összetekeredik (f-aktin).

A vékony filamentumot a *tropomiozin* stabilizálja: egy kétláncú, α -hélix szerkezetű 70 kDa tömegű fehérje, mely összetekeredik a vékony filamentummal és nyugalmi állapotban gátolja az aktin-miozin kölcsönhatást (2. ábra).

A vékony filamentum felépítésében szabályozóként szerepelnek a *troponinok*. A troponin-komplex a troponin C-ből, T-ből és I-ből áll. A troponin I (24 kDa) az aktint köti és megakadályozza a miozinnal való kereszthidak létesítését (inhibitoros alegység). A troponin C (18 kDa) kalcium-kötő fehérje, kalcium-kötött állapotban gátolja az I alegység működését: a troponin I elmozdul az aktin és a miozin molekulák közül és létrejöhethet a keresztkötés. A troponin T (37 kDa) a tropomiozinhoz rögzíti a komplexet.

A *titin* (régi nevén *connectin*) az elasztikus filamentum alkotója, a legnagyobb ismert fehérje, ami molekuláris rugóként funkcionál. A vastag filamentumot rögzíti a Z-lemezhez. Az izom passzív nyújthatóságáért felelős (2. ábra). (Labeit és mtsai 1990)



2. ábra. A vékony és a vastag filamentumok szerkezete, kapcsolata. (Damjanovich és mtsai, 2007)

A *sarcolemma* az izomrost plazmamembránja, és az idegsejtekből eredő stimulus (akciós potenciál) tovaterjedésében játszik fontos szerepet. Betüremkedései körülveszik az izomfibrillumokat (T tubulus), így a hosszú rostok is időben szinte egyszerre képesek aktiválódni, összehangolva az izom-összehúzódást. Az izomrost két végén a sarcolemma az inakhoz rögzíti a sejtet.

A *sarcoplazmaticus retikulum* (SR) egy speciális, sima felszínű endoplazmatikus retikulum, ami minden miofibrillumot körülvevő hálót alkot a sejt belsejében. Zsákszerű kiszélesedései a terminális ciszternák. Fő funkciója az intracellulláris kalcium raktározása.

A myofilamentumok az izomfibrillumon belül szabályosan rendeződnek el. Két Z lemez közötti rész a szarkomera, ami a miofibrillumok szerkezeti egysége, és adja az izom elnevezésében közrejátszó harántcsíkolatot. A *m. biceps brachii*-ban, például, kb. 100000 szarkomera kapcsolódik egymáshoz egy izomrostban. A szarkomerán belül az aktin filamentumok a Z-lemezhez kapcsolódnak és a miozin filamentumokat is ide rögzíti a titin. Az aktin a szarkomera két szélén helyezkedik el, míg a miozin molekulák a szarkomera közepén. Az átfedésben lévő részen az aktin és a miozin egymás mellett történő elcsúszása hozza létre az izommunkát (2. ábra).

A vázizom-összehúzódnás mechanizmusa

Idegimpulzus hatására a vázizomsejtek membránján terjedő akciós potenciál később részletezett módon az intracelluláris kalcium-koncentráció emelkedéséhez vezet. Ekkor a troponin C kalcium-kötése miatt, konformáció-változások sorozatával a tropomiozin szabaddá teszi a miozin-kötő helyet az aktinon. Ezáltal az aktinhoz tud kötődni az ATP-miozin komplex (a miozin feji része), és a kapcsolódás hatására végbemegy az ATP teljes hidrolízise, és a P_i disszociációja. A felszabaduló kémiai energia hatására a miozin nyaka konformáció-változáson megy keresztül, és az aktint magával húzza, elmozdítja a miozinhoz képest (*sliding filament* mechanizmus, erőgenerálás). ADP disszociál a kötőhelyről. A szabad kötőhelyre újabb ATP molekula kötődhet be, ekkor az aktin-miozin kapcsolat megszűnik. Ha az intracelluláris kalcium-koncentráció továbbra is kellően magas ahhoz, hogy a troponin C molekula kalciumot kötött állapotban legyen, a fenti lépések sorozatos ismétlődése révén a szarkomerák egyre nagyobb mértékű rövidülése következik be, létrehozva az izomösszehúzódnást (a kémiai energia mechanikai energiává alakul).

A vázizom összehúzódnása során az energiát az ATP szolgáltatja. Azonban az ATP tartalékok nagyon hamar, kb. 1 s alatt kiürülnek. Tartós izommunka esetén az ATP-t az izmok több forrásból és többféle módon pótolhatják: glikogén vagy glukóz metabolizmus (glikolízis), oxidatív foszforiláció, kreatin kináz reakció, purin nukleotid ciklus, lipid metabolizmus. (Darras 2017)

A vázizomrostok típusai

A vázizomrostokat többféle szempont szerint lehet kategorizálni. Egyik elterjedt csoportosítás a miozin ATP-áz aktivitásán alapul: így a legjelentősebb különbség a kontrakció sebességében lesz, mivel a magas ATP-áz aktivitás gyorsabb kontrakciós ciklusokat

eredményez. Az I. típusú rostok ATP-áz aktivitása alacsony, aerob energiatranszfer biztosítja az ATP-ellátottságot. Sok mitokondriummal, myoglobinnal és bőséges kapilláris-hálózattal rendelkeznek. Kontrakciós idejük hosszú: 100 ms, 10-30 Hz (*slow twitch*). A *fast twitch*, II.B típusú rostok energia-ellátásukat a rövid távú, glikolitikus folyamatok dominálják, (sok glikogén és miozin-ATPáz), így 2-3-szor olyan gyorsan tudnak összehúzódni, mint a lassú izomrostok (30-70 Hz). Az izomrostok felsorolása összehúzódási idő szerint rangsorolva (leghalábbtól a leggyorsabbig): I.- I.C- II.C- **II.A- II.D- II.B.** (*Westwood és mtsai: 2005*) A miozin nehézlánc (MHC) típusok alapján is lehet csoportosítani, az így képzett csoportok nagyjából megfeleltethetők egymásnak (1. táblázat).

Izomrostok csoportosítása	
ATP-áz aktivitás	MHC
I. típus	MHC I β
IC. típus	MHC I β > MHC IIa
IIC típus	MHC IIa > MHC I β
IIA típus	MHC IIa
IIB típus	MHC I Ib

1. táblázat. Az izomrostok csoportosítása ATP-áz aktivitás és MHC alapján.

Az egyes izmokat különböző típusú izomrostok alkotják, különböző arányban. Az izmok rostösszetétele nem konstans: funkciófüggő módon változhat. A gyors izmokban több a II. típusú izomrost, míg a lassú izmokban az I. típusú izomrostok dominálnak.

Az elektromechanikai kapcsolat (ECC)

Az idegsejtekből terjedő akciós potenciál a továbbterjed a sarcolemmán és a T-tubulusok segítik az elektromos ingerület rost belesjébe jutását. A SR terminális ciszternái a T tubulust két oldalán, szoros fizikai közelségben helyezkednek el, ez az anatómiai képlet a triád. A triádban foglalnak helyet az elektromechanikai kapcsolat kialakításáért felelős molekulák: a dihidropiridin-receptorok (DHPR) és a rianodin receptorok (RyR). Minden második RyR szoros kapcsoltban áll egy DHPR-tetráddal. A triád két oldalán két, elkülönítve működő funkcionális egység a „couplon”, melyet a RyR-k, DHPR-k és a többi junkcionális fehérje együttese alkot. Ennek feladata az elektromos ingerület mechanikai válasszá történő alakítása, és a kettő közötti kapcsolat kialakításáért az intracelluláris kalcium-jel felelős. Elterjedt megnevezés a kalcium-felszabadító egység (Calcium Release Unit, CRU), ami a két különálló membrán találkozásánál jön létre (sarcolemma és SR); vázizom esetén a triád

alkotja. A vázizomrostok a kontrakcióhoz szükséges kalcium-jelet teljes egészében az intracelluláris raktárából (SR) biztosítják, külső, extracelluláris kalcium belépésére nincs szükség. A vázizom szövetre jellemző, hogy az akciós potenciál időtartama olyan rövid, hogy az izomkontrakció kezdetekor a membrán elektromosan már újra ingerelhető (tetanizálható). Ilyenkor a rostok intracelluláris kalcium-koncentrációja emelkedett, és egy újabb akciós potenciál hatására további kalcium szabadul fel a RyR-n keresztül. A magasabb kalcium-koncentráció következményesen növeli az izom-kontrakció erejét, mivel emelkedik a troponin C-hez kötött kalcium mennyisége. A sarcolemma tartós repolarizációja a kalcium-felszabadulás kaszkádját megállítja, és az intracelluláris kalcium visszavételeződik a SR-be a SERCA pumpa segítségével (3. ábra). *(Ríos és mtsa 1997, Lytton és mtsai 1992, Block és mtsai 1988)*

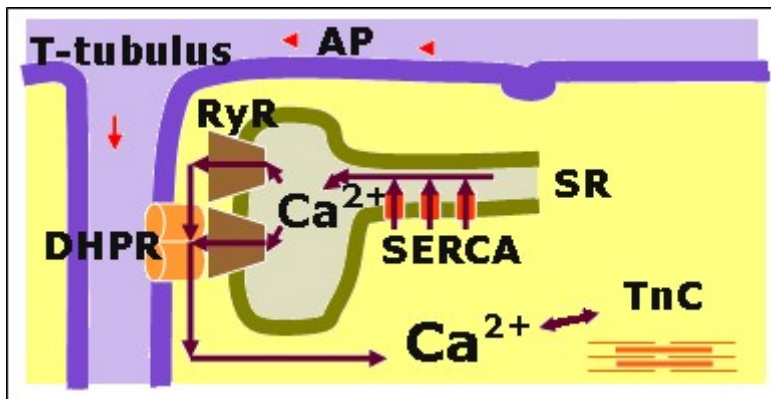
A dihidropiridin-receptor (Cav1.1)

A dihidropiridin-receptor lassú kinetikájú, feszültségfüggő L-típusú Ca^{2+} csatorna, aktivációs küszöbe -35 mV . Kb. 440 kDa tömegű, öt polipeptid alegységből áll. Az $\alpha 1$ -alegység tartalmazza a csatorna pórusát és az organikus csatorna-gátlók is ide kötődnek, pl. a névadó dihidropiridin. A vázizomban ez az alegység tartalmaz egy citoplazmatikus nyúlványt, ami a sejtmembrán depolarizációját érzékeli és ennek következtében konformáció-változáson megy keresztül. Az $\alpha 1$ és az intracelluláris β alegység foszforilációs helyeket tartalmaz, ami a csatorna inaktivációjában játszik szerepet. További alegységei az erősen glikozilált $\alpha 2$, és a transzmembrán γ és δ alegységek.

A csatorna a plazmamembrán feszültségváltozásának hatására befelé irányuló, hosszan tartó Ca^{2+} -áramot hoz létre. Vázizomban a T-tubulus membránban négyesével csoportokat képezve fordul elő. Ez a négyes csoport mechanikai kapcsolatban áll egy, az SR membránban elhelyezkedő RyR-al.

A sarcolemma mentén terjedő gyors ($3\text{-}5 \text{ ms}$) akciós potenciál aktiválja a DHPR-t, ami azonnali konformáció változáson megy keresztül ($\alpha 1$ alegység, ld. fent). A csatorna lassú kinetikája miatt a nyitása több időt vesz igénybe, mint egy akciós potenciál, így Ca^{2+} -t nem is enged be egy akciós potenciál alatt. A konformáció-változás okozza a szoros fizikai közelségben lévő RyR aktivációját, és ennek hatására indul meg az SR-ből a Ca^{2+} kiáramlás. Ez a kezdeti kalcium-koncentráció emelkedés a kalcium-indukálta kalcium felszabadítás

révén további RyR-kat nyit meg, így az intracelluláris kalcium-koncentráció gyorsan emelkedhet (3. és 4. ábra).



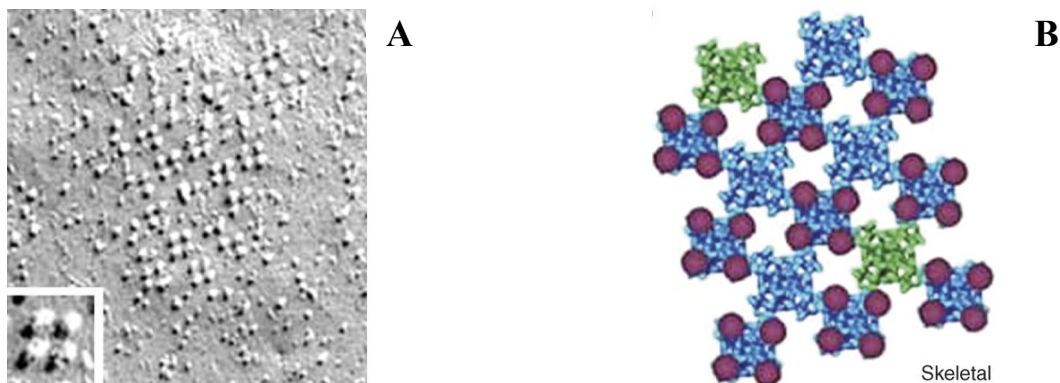
3. ábra. Az elektromechanikai kapcsolat működése vázizomban. Az intracelluláris raktárból történő Ca^{2+} felszabadulás mechanizmusa, kapcsolata a kontrakciós elemekkel és visszavételezése a raktárba. AP: akciós potenciál, TnC: troponin C. (Szentesi és mtsai 2019)

A rianodin receptor

A rianodin receptor egy kb. 2 MDa molekulatömegű fehérje, homotetramer szerkezetű. A RyR alacsony szelektivitású kation csatorna, nagy konduktanciával. Vázizomban elsődlegesen ligand vezérelt Ca^{2+} csatornaként funkcionál, feladata nagy mennyiségű Ca^{2+} gyors mobilizálása az SR-ből. A rianodin receptornak 3 izoformája ismert: a RyR1 legnagyobb számban a vázizomzatban fordul elő, a RyR2 szívmizmon, a RyR3 pedig döntően az agyban, illetőleg embrionális vázizmokon is jelen van. Utóbbi a kifejlett izomból szinte teljesen eltűnik, csak a lassú izmokban, mint például a rekeszizom vagy a szemmozgató izom marad meg minimális mennyiségben az egyedfejlődést követően. A RyR1 egyrészt egy kiterjedt citoszolikus részből áll (α -solenoid scaffold), ami a fő regulatorikus fehérjéket kapcsolja a pórushoz. A RyR pórusának szerkezete a hat transzmembrán ioncsatorna szupercsalád szerkezetével homológ, és egy egyedi domain épül be a második és a harmadik transzmembrán hélix közé, ami az α -solenoid scaffold páros EF-kéz motívumával kerül interakcióba és a csatorna Ca^{2+} kapuzását biztosítja. (Nelson és mtsai 2002)

Vázizomban a RyR-k sakktábla-szerűen rendeződnek el: minden RyR-hez négy másik kapcsolódik a "sarkoknál". Csak minden második RyR lép kapcsolatba a DHPR-vel. A vázizomban a kalcium-indukálta kalcium felszabadítás a DHPR kalcium csatorna funkciója

nélkül jön létre, és a RyR-n keresztüli kalcium-felszabadulás aktiválja a szomszédos, DHPR-el kapcsolatban nem lévő RyR-eket (4. ábra).



4. ábra. A vázizomrostok Ca^{2+} felszabadító egysége (CRU). *A: Tetrádokba rendeződött DHPR-ek elektronmikroszkópos képe vázizomban. B: Lila: DHPR tetrádok, zöld és kék: RyR1. (Yin 2008)*

A RyR szabályozása

A RyR csatorna-funkcióját fiziológiásan alapvetően maga a *kalcium* szabályozza: intracellulárisan nM-os koncentráció aktiválja, μM -os koncentráció gátolja a RyR nyitását: a RyR nagy affinitású Ca^{2+} -kötőhelye aktivátor, míg alacsony affinitású Ca^{2+} -kötőhelye gátolja a RyR csatorna-funkcióját. Emellett az SR lumenális Ca^{2+} koncentrációja is szabályozó szereppel bír: a magas SR Ca^{2+} -koncentráció fokozza a RyR nyitvatartási valószínűségét, mivel a RyR lumenális oldalán is található Ca^{2+} -kötő hely, ami a csatorna aktivitását fokozza. (Meissner és mtsai 1986, Csernoch 1999)

Fiziológiásan az intracellulárisan magas (nagyobb, mint 1 mM) *magnézium*-koncentráció gátolja a RyR működését. Egyik elmélet szerint a Mg^+ kompetitíven gátolja a nagy affinitású, aktiváló Ca^{2+} -kötőhelyet (Jóna és mtsai 2001), míg a másik elmélet szerint a Mg^+ az alacsony affinitású helyért verseng a Ca^{2+} -al és ehhez kötődve a csatorna inaktivációját okozza. (Zucchi és mtsa 1997)

Az ATP potens RyR aktivátor, mely Ca^{2+} hiányában is aktiválja a RyR-t, Ca^{2+} -al együtt submaximális aktivációt okoz. (DHPR aktiváció önmagában nem elég, az ATP egy szolubilis agonista). Az ATP hatása nem a csatorna foszforilációján keresztül valósul meg. További agonisták az AMP, ADP, cAMP, adenin, adenzin: a magnézium hatásának ellensúlyozása a szerepük. A citidin-, guanozin-, inozitol- és uridin-trifoszfát kevésbé hatékony. (Zarka és mtsa

1993) A RyR aktivitását *foszforliáció* útján is lehet szabályozni. A szimpatikus idegrendszer aktivációja katekolaminok felszabadulásával jár, amik az izomban aktiválják a PKA-t. A PKA foszforilálja és aktiválja a RyR-t, a DHPR-t, és a SERCA-t: így a szimpatikus aktiváció az ezidő alatt bekövetkező akciós potenciál által generált Ca^{2+} tranzienst amplitúdóját emeli. A RyR defoszforilálásában a protein foszfatáz 2B, vagyis calcineurin vesz részt. (Strand és mtsai 1993)

Farmakológiai agonisták: a *4-kloro-m-krezol* és a *suramin* direkt aktivátorok. A *xantinszármazékok*, pl. a *koffein* a receptor érzékenységet növeli a natív ligand, a Ca^{2+} iránt. A koffein 5 mmol/l koncentráció felett adagolva a RyR Ca^{2+} - szenzitivitását jelentősen, mikromolárisról pikomoláris tartományba növeli, ezért a nyugalmi Ca^{2+} koncentráció is aktiválja a RyR-t. Alacsonyabb koffein-koncentráció a RyR-k kvantális aktivációihoz vezetnek. A sebészeti altatásokhoz használt *halothan* is növeli a RyR Ca^{2+} permeabilitását. (Xu és mtsai 1998)

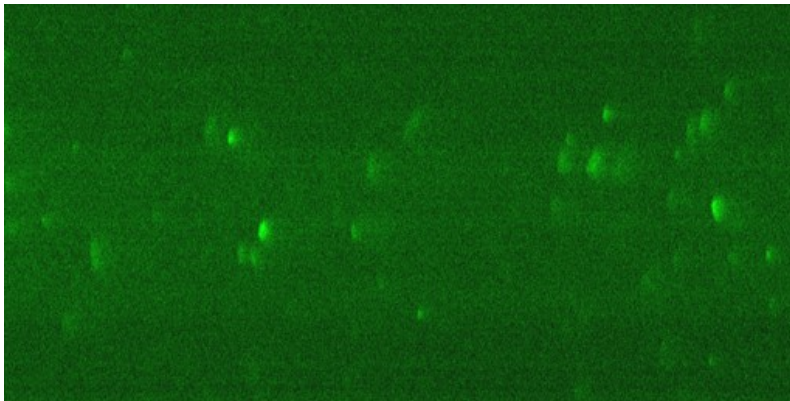
A receptor antagonistái: a névadó *rianodin* egy mérgező növényi alkaloid, a Dél-Amerikai *Ryania speciosa*-ból izolálták és rovarirtó szerként használták. Nagy affinitással, specifikusan kötődik a nyitott RyR-hez, és nanomoláris koncentrációban félig nyitott állapotban, mikromoláris koncentrációban zárt állapotban rögzíti a csatornát. A félig nyitott állapotban rögzített RyR-n keresztül Ca^{2+} szivárog (*leak*) a citoszolba, melynek következménye a kalcium-raktárak kiürülése és masszív izomkontrakció. A mikromoláris gátlás eredménye paralízis, mind emlősökön, mind a rovarokon. A klinikai gyakorlatban *Dantrolent* használnak, emellett további antagonisták *procain*, *tetracain* (lokál anesztetikumok) és a *ruténium-vörös*. (Vites és mtsa 1994)

2. A kalcium jelátvittele

A kalcium az emberi szervezetben a legnagyobb mennyiségben előforduló elem. A vérben 1,3-1,5 mmol/l kalciumion található, intracellulárisan alacsonyabb a koncentrációja, kb. 100 nM, amit aktív folyamatokkal tartanak fenn a sejtek. Ezért intracellulárisan nagy koncentráció-változások alakulhatnak ki gyorsan, így kiváló másodlagos hírvivő; az egyik leggyakrabban előforduló, legtöbb sejt-folyamatban részt vevő szekunder messenger molekula, precízen szabályozott és flexibilis. Az intracelluláris kalcium-koncentráció térben, időben (időtartam, frekvencia) és amplitúdóban bekövetkező változása egyaránt információt hordoz a sejtek számára. (Diem és mtsa 1971, Berridge és mtsai 1998)

Az elemi kalcium-felszabadulási események

Az elemi Ca^{2+} felszabadulási esemény (ECRE, Elementary Calcium Release Event) jelenleg kisebb egységekre nem bontható, lokális intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció-emelkedés: egy rianodin receptor-cluster megnyílásának eredményeként felszabaduló Ca^{2+} -mennyiség. Speciális technika mellett rögzíthető és ábrázolható: felfedezését a konfokális mikroszkópia fejlődése tette lehetővé, ami kis térben ($0,4 \times 0,4 \times 0,8 \mu\text{m}^3$) képes követni fluoreszcencia változásokat. Emellett elengedhetetlen olyan fluoreszcens kalciumindikátor használata, aminek kellően alacsony a háttér fluoreszcenciája, hogy a kismértékű fluoreszcencia-intenzitás-emelkedés az izomrost nyugalmi Ca^{2+} -koncentrációja mellett is pontosan detektálható legyen. Az elemi eseményeknek több formája van, a legalapvetőbb a *kalcium-spark*. (5. és 6. ábra) Úgy tartjuk, hogy a spark az excitációs-kontrakciós kapcsolat fontos, a folyamatot iniciáló eleme. A spark által reprezentált lokális Ca^{2+} -koncentráció emelkedés fúziója és generalizációja következtében jön létre a globális intracelluláris Ca^{2+} -tranziens, ami a sejtek extracelluláris stimulusra adott intracelluláris válaszának egyik közös jelátviteli útja. A spark megjelenési formája a kapcsolt RyR-k kapuzási mechanizmusát követi, ezért a CRU-k működéséről szolgáltat információt: többek között a kapuzásáról és a fiziológias kalcium-fluxusról.



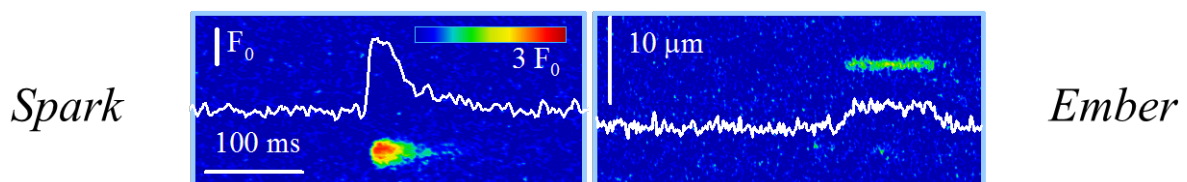
5. ábra: Kalcium sparkok emlős vázizom roston *A függőleges (y) tengely a rost hossz tengelyével párhuzamos fizikai kiterjedés, a vízszintes (x) tengely idő dimenzió (saját anyag)*

A spontán Ca^{2+} sparkot 1992-ben fedezte fel Cheng és Cannell szívizmon. Először a Nature elutasította a közleményüket, műtermékek véleményezve, de hamar fény derült az izom-élettanban betöltött alapvető szerepére. (Cheng és mtsai 1993, Tsugorka és mtsai 1995) Később leírták, hogy kételtűek harántcsíkolt izmán is, az intakt rostokon nagyszámú spark

figyelhető meg (Klein és mtsai 1996). Emlős vázizmon ellenben a spontán ECRE-k jóval ritkábban fordulnak elő. (Shirokova és mtsai 1998) Az embrionális emlős vázizmokon még lehet spontán sparkot detektálni, ennek oka a RyR1 és RyR3 koexpressziója. A fejlődés során a RyR3 eltűnik, így spontán elemi események nem figyelhetőek meg, de különböző eljárásokkal felfedhetőek. Leírták pl., hogy exogén RyR3 expresszió mellett depolarizáció hatására felnőtt vázizmon is számos spark jelent meg, míg RyR1 overexpresszió mellett ezt nem tapasztalták. Kételtűek vázizmán a RyR1 és RyR3 izoforma is jelen van, ez magyarázza, hogy jóval nagyobb számban lehet elemi eseményeket detektálni. (Pouvreau és mtsai 2007) Izomdisztófiában, különösen mechanikai stressz következtében, megemelkedik a spark frekvencia. (Kirsch és mtsai 2001, Zhou és mtsai 2003, Zhou és mtsai 2006)

Az elemi kalcium-felszabadulási események fajtái

Mind kételtűek, mind emlősök vázizmán a legáltalánosabb elemi esemény a spark. A spark a citoszolikus Ca^{2+} -koncentráció időben rövid: általában 10-20 ms ideig tartó; térben erősen lokalizált (2-3 μm) átmeneti emelkedése. Jellemzői a rövid rise time (a csúcshoz szükséges idő), az exponenciális lecsengés a csúcshoz, és hogy a térbeli kiterjedése Gauss-eloszlást követ. (6. ábra) A sparkot kb. 20 csatorna időben egyszerre történő megnyílásának tartjuk, a nyitott csatornák száma egy elemi esemény során állandó. A koordinált nyitás direkt mechanikai intervenció következménye lehet, amit a spark kerek morfológiája is alátámaszt. Megszűnésében szerepet játszhat az SR lokális Ca^{2+} depléciója mellett az emelkedett Ca^{2+} koncentráció RyR csatorna-funkciót gátló szerepe. Emlős vázizmon az események kb. 2/3-része *spark*, míg a többi *ember* (6. ábra), vagy a kettő kombinációja. Emlősök esetén az *embert* tekintjük az abszolút elemi eseménynek, mivel jelenleg egy RyR megnyílásának a következményének tartjuk. Az *ember* térbeli lokalizáltsága nagyon hasonló a sparkhoz, azonban amplitúdója sokkal kisebb és időben sokkal hosszabb. (Klein és mtsai 2006, Csernoch 2007, Kirsch és mtsai 2001, Zhou és mtsai 2003, Cheng és mtsai 1993, Cheng és mtsai 1999, Seville és mtsai 2005, Endo 1977)



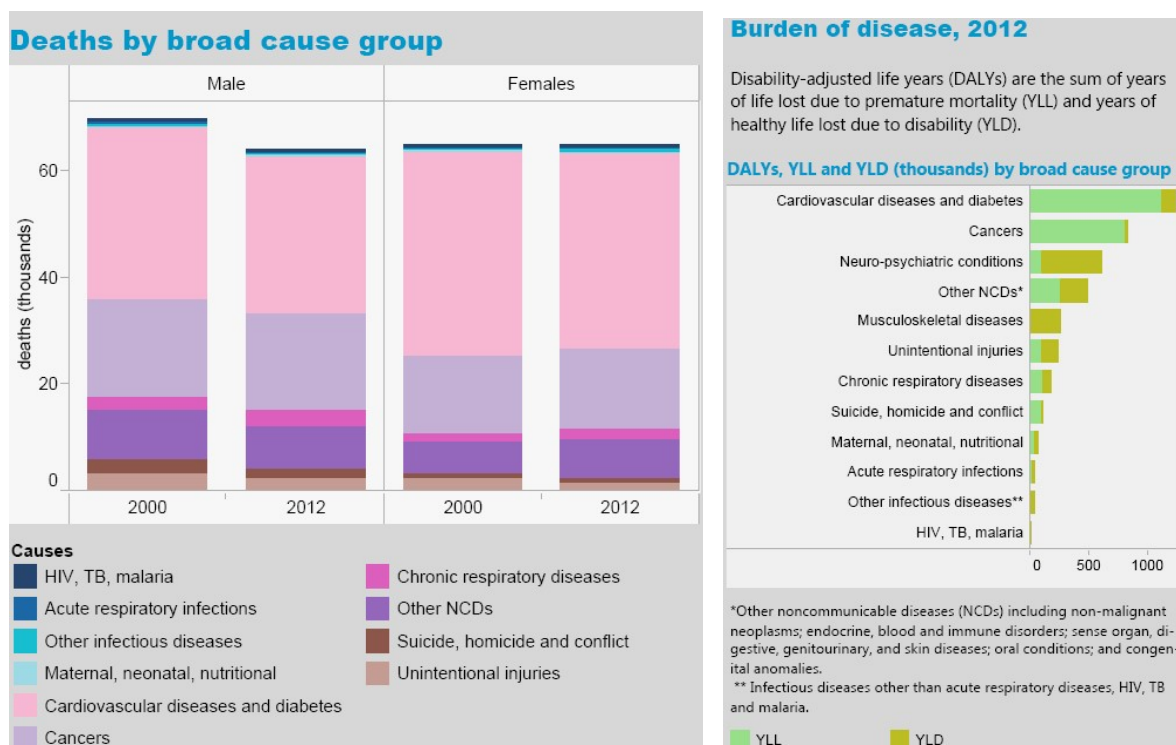
6. ábra. Elemi kalcium-felszabadulási események fajtái. Spark: rövid, magas amplitúdójú. Ember: hosszú, kis amplitúdójú. F_0 : nyugalmi fluoreszcencia (saját anyag)

3. A koleszterin

A koleszterint 1815-ben fedezte fel M.E. Chevreul, francia kémikus. Az emlős sejtmembrán fontos alkotóeleme, a membrán-fluiditás és permeabilitás modulátora, fontos szerepe van a lipid-tutajok és a kaveolák kialakításában. (Yeagle 1991) A szteroid hormonok, az epesavak és a D vitamin prekursora. (Payne és mtsa 2004) A membrán transzport, transzmembrán jelátvitel (pl. a G-proteinekhez kapcsolt jelátvitel) és a sejtprolifерáció fontos eleme. (Incardona és mtsa 2000) Az abnormális szérumban koleszterin-szint olyan, rendszer-szintű betegségek kialakulásához vezethet, mint az érlelmeszesedés. Rudolf Virchow német patológus már több, mint 100 éve kimutatott koleszterint a szívinfarktus miatt elhunyt emberek artériáinak falában. (Tobert 2003)

A Framingham-tanulmány volt az egyik első vizsgálat, ami populációs szinten is bizonyította az emelkedett szérumban koleszterinkoncentráció és a kardiovaszkuláris eredetű halálozás közötti összefüggést. Ez azért kiemelt jelentőségű, mert a XX. században egyre inkább a nem-fertőző betegségek vezeték a halálozási statisztikákat: az érlelmeszesedés talaján kialakuló szív-érrendszerrel összefüggő mortalitás a vezető halálok nemcsak a fejlett országokban, de világviszonylatban, és Magyarországon is (7. ábra). Több millió ember haláláért felelős jelenleg is, és egyre nagyobb az érintettek aránya. Emellett a betegség által a társadalomra rótt teher is óriási: nemcsak a korai halálozásért felelős, de rokkantságban eltöltött életévekhez is vezet. (History of the Framingham Heart Study, The top 10 causes of death) 2011-ben a csak a koszorúereket érintő atherosclerosis egyike volt a tíz legköltségesebb egészségügyi ellátásoknak az USA-ban, az ebből eredő teljes kórházi költség 10,4 milliárd \$-nak adódott. (Pfuntner és mtsai 2013)

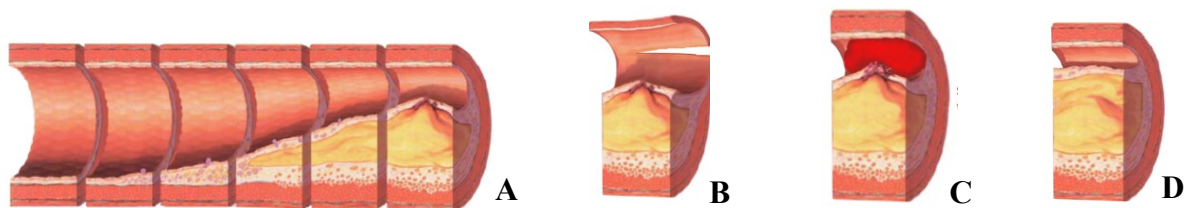
Az érlelmeszesedés kialakulása lassú, több évtizeden keresztül zajlik. Panaszokat vagy tüneteket csak előrehaladott állapotban okoz, férfiaknál általában 40 év felett, nőknél 50-60 év felett. A szervezet artériái bárhol érintettek lehetnek: a szív- vagy agyi infarktus (stroke) akár azonnali halált okozhat; emellett súlyos, alsó végtagi mozgással összefüggő fájdalom, vagy a veseartériák érintettsége esetén súlyos magas vérnyomás vagy veseelégtelenség is kialakulhat következményeként.



7. ábra. A WHO magyarországi statisztikája: mortalitás és betegség-teher. A: A cardiovascularis betegségek vezetnek a halálozási statisztikát. B: A szív-érrendszeri betegségek miatti betegség-teher. (Hungary: WHO statistical profile)

Az atherosclerosis a nagy artériák intima rétegében bekövetkező progresszív, lipid- és inflammatorikus sejt felhalmozódással jellemezhető gyulladásos folyamat. Az érlemezés patomechanizmusában alapvető szerepe van az ApoB-tartalmú keringő lipoproteineknek. A 70 nm-nél kisebb átmérőjű ApoB tartalmú lipoproteinek átjutnak az endothel rétegen, ahol pl. proteoglycanokkal történő interakció során csapdába kerülnek és felhalmozódnak az artériák falában. Az egyre növekvő lipid depozitumok atheroma, meszes plakk kialakulást eredményeznek, ami a plakk megrepedésével járhat. A sérült plakk thrombotikus folyamatokat indukál: thrombus kialakulásához vezet, ami akut érelzáródást: instabil anginát, akut szívinfarktust vagy halált okozhat. (2019 ESC/EAS guidelines for the management of dyslipidaemias) (8. ábra)

Az ApoB-vel rendelkező lipoproteinek döntő többsége LDL-koleszterin. Emiatt az LDL-koleszterin koncentráció csökkentésének keimelt szerepe van az akut kardiovaszkuláris betegségek primer és szekunder prevenciójában egyaránt. (2019 ESC/EAS guidelines for the management of dyslipidaemias)

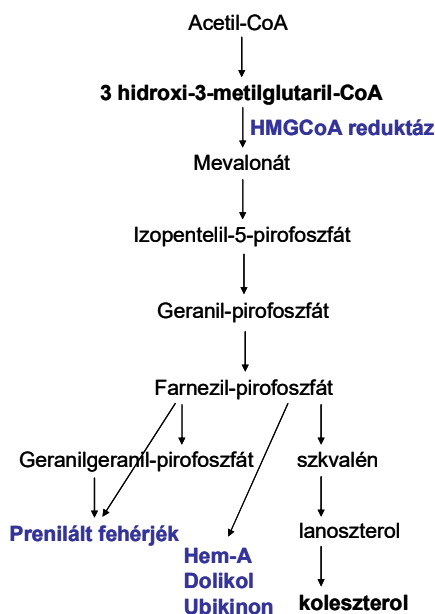


8. ábra. Az atherosclerosis kialakulásának folyamata és szövődményei. *A: Az érlemezsedés kialakulása. Az érlemezsedés szövődményei: B: Aneurisma és ruptura. C: Thrombus. Elzárja az érlument. D: Kritikus szűkület, a mögöttes területek vérellátása nem elégséges. (Stages of endothelial dysfunction in atherosclerosis) (Ross 1993, Ross 1999)*

A koleszterin

Az emlős sejtek vagy a táplálékkal veszik fel a koleszterint, vagy de novo szintetizálják. Az endogén bioszintézis a jelentősebb koleszterin-forrás, emberben 70%-ban így képződik a szervezetben lévő koleszterin.

A szervezet közel összes sejtje képes a koleszterin szintézisére, azonban a májsejtek annyi koleszterint állítanak elő, mint a szervezet összes sejtje együtt. A koleszterin a citoplazmában, az endoplazmatikus retikulumban szintetizálódik acetyl-coenzim A-ból, a mevalonát útvonalon keresztül (9. ábra). A sebességmeghatározó enzim a HMG-CoA-reduktáz, (féléletideje 4 óra), ami a HMG-CoA-mevalonát átalakulást katalizálja. Az első, koleszterin-irányban elkötelezett lépés a szkvalén-lanoszterol átalakulás.



9. ábra. A koleszterin szintézise. *(Ikonen 2008 nyomán)*

A HMG-CoA reduktáz fiziológias szabályozásában a képződött koleszterinnek van a legfontosabb szerepe: a koleszterin gátolja az enzim aktivitását és szintézisét. Hormonális szabályozói közül az inzulin és trijód-tirozin aktiválja, míg a glukagon és a kortizol gátolja az enzim működését. A HMG-CoA reduktáz enzim diurnáris ritmus szerint működik, éjszaka a legaktívabb, és ébredés után 6 órával a legalacsonyabb az enzim aktivitása. A HMG-CoA reduktáz enzim farmakológiai gátlásával csökkentik a koleszterin-szintet a statinok, a leggyakrabban használt koleszterin-csökkentő gyógyszerek. (Marshall, 1995)

A táplálékkal felvett koleszterin negatívan regulálja a de novo szintézist. A koleszterin a vékonybélben szívódik fel. Az ezetimibe gátolja a vékonybélből történő koleszterin felszívódást. A hidrofób lipidek a vérkeringésben egy hidrofil burokba csomagolva szállítódnak a lipoproteinek segítségével, pl. a HDL, LDL. A burok apoproteinekből és foszfolipidekből áll, ezen belül helyezkednek el a zsírok, a koleszterin, a koleszterin-észterek és a triglicerid. A lipoproteineket fehérjetartalmuk szerint csoportosítva nevezték el, minél nagyobb a fehérjetartalom, annál nagyobb a lipoprotein denzitása (2. táblázat).

Lipoprotein:	fehérje %	lipid %	fő lipid	fő apoprotein
Kilomikron	1-2%	98-99%	triglicerid	B 48, C-II, C-III, E
VLDL	7-10%	90-93%	triglicerid	B-100, C-I, C-II, C-III, E
IDL	15-20%	80-85%	triglicerid, koleszterin-észter	B-100, E
LDL	20-25%	75-80%	koleszterin-észter	B-100
HDL	40-55%	50-55%	foszfolipid, koleszterin-észter	A-I, A-II, C-I, C-II, C-III, E

2. táblázat. Lipoproteinek (Marshall 1995 nyomán)

A szervezet legtöbb sejtje az LDL-ből nyeri a koleszterint. A májsejtek felveszik a keringő LDL kb. 50%-át, emellett a bél, a mellékvese és a gonádok a legnagyobb felhasználók. A keringő LDL koncentráció egyenes arányban áll az érlelmeszesedés kialakulásának valószínűségével. A HDL koleszterint gyűjt más lipoproteinekből, vagy sejtek membránjából, pl az artériák falából. A HDL-koleszterin legnagyobb részét a máj veszi fel. (reverz koleszterin transzport). Korábban obszervációs vizsgálatok igazolták, hogy a plazma HDL koleszterin koncentráció fordított arányosságban áll az érlelmeszesedés kockázatával. Jelenleg randomizációs vagy genetikai vizsgálatok nem igazolják egyértelműen, hogy a terápiás

HDL-koncentráció emelés csökkentené a kardiovaszkuláris betegség kialakulásának kockázatát. (2019 ESC/EAS guidelines for the management of dyslipidaemias)

A koleszterint a szervezet különböző sejtjei a sejtfelszíni LDL receptorokkal veszik fel. Az ic. szabad koleszterin negatív visszacsatolással gátolja az LDL-receptorok szintézisét, felgyorsítja a HMG-CoA reduktáz lebontását, ill. gátolja az enzim transzkripcióját. Az LDL intracelluláris felvétele egyidejűleg az acil-CoA-aciltranszferáz aktivációját eredményezi, ami a szabad koleszterint újra észteresíti, így megszünteti a negatív regulációt. A koleszterin-észterek lipid-cseppecskék formájában tárolódnak a citoplazmában, melyből a CEH (koleszterin-észter hidroláz) enzim könnyen mobilizál szabad koleszterint. Genetikai betegség következtében létrejövő LDL-receptorok számának csökkenése vagy funkciójának hiánya familiáris hypercholesterinaemia kialakulásához vezet.

A koleszterin leggyakrabban különböző membránokba épül be, pl. a plazma membrán, az ER, vagy a mitokondrium. A plazmamembrán lipidjeinek kb. 20-25%-a koleszterin. Sok koleszterin található pl. a Golgi-készülékben, de az ER koleszterin tartalma viszonylag alacsony, és ott szabályozó funkciója van. A membránokban a koleszterin növeli a rendezettséget, a fluiditást és hozzájárul a szemi-permeabilitás kialakításához. A koleszterin részt vesz a plazmamembrán laterális organizációjában: pl. lipid-tutajok kialakításában, amik alapvető fontosságú területek: jelátviteli-, membrán-transzport- vagy sejt-adhézis és az apoptotikus folyamatokban játszanak szerepet. A koleszterin egy része oxiszterollá alakul, így szabadon mozog a citoszolban is, és hírvivő lipid funkciót láthat el. Oxiszterolként ürül a májsejtekből a felesleges koleszterin egy része is (epesavként). Emellett a koleszterin több hormon alapja: pl. a mellékvese hormonok, a nemi hormonok és a D vitamin előanyaga. (Ghada, 2018)

A vázizomban a T-tubulus rendszer koleszterin koncentrációja magasabb, mint a plazma-membrán felszíni részének, a teljes membrán koleszterin-tartalom 80%-a itt található. A szfingolipid koncentráció is magas, ez a szerkezet a lipid-tutajok felépítéséhez hasonlít. A T-tubulus membrán koleszterin tartalma módosítja az itt található, elektromechanikai kapcsolat kialakításában részt vevő fehérjék funkcióját (DHPR). Metil- β -ciklodextrinnel (M β CD) történő részleges koleszterin-eltávolítás hatására a disszociált felnőtt rostok elektromechanikai kapcsolata megszűnik, és a rost depolarizálódik. A rostok nyugalmi ic. kalcium-koncentrációja emelkedik, az ic. raktárakból kalcium szabadul fel. Ezek alapján feltételezhető, hogy a T-tubulus membrán koleszterin koncentrációja befolyásolja az elektromechanikai

kapcsolatot: direkt interakcióban a fehérje-komplexumokkal (pl. DHPR), és indirekt módon, a lipid környezet megváltoztatása és a járulékos fehérjékkel pl. a kaveolin 3-al történő interakció révén. *(Barrientos és mtsai, 2017)* Akut koleszterin-elvonás hatására a primer tenyésztett csirke-vázizomsejtek proliferációja fokozódik. *(Portilho és mtsai 2012)* Ezzel szemben a vázizom membránok koleszterin-dúsításának elektro-mechanikai kapcsolatra vagy ic. kalcium-koncentrációra gyakorolt hatása nem ismert. *(Barrientos és mtsai 2017)*

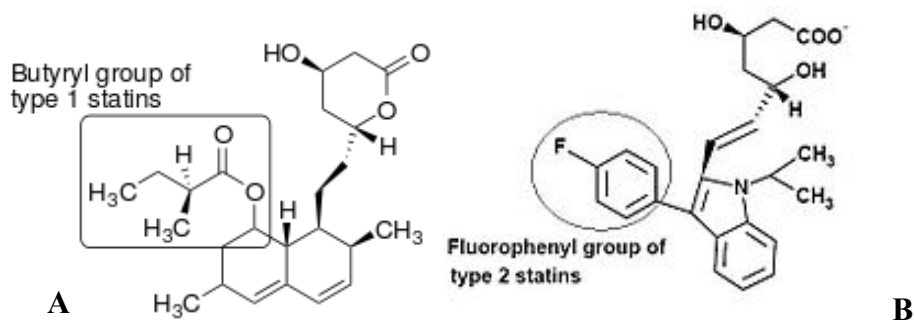
Mivel a szervezetünk sejtjei nem tudják a koleszterint lebontani, a felesleges koleszterint leadják: passzív diffúzióval, vagy apolipoprotein-mediáltan (Apoprotein A1). Passzív diffúzió során a sejtmembránból a HDL-re kerül a koleszterin. A máj, vagy pl. az agy a HDL-ből képes koleszterint felvenni scavenger receptor segítségével (SRB1). A HDL-ből a koleszterin-észterek az LDL-re kerülhetnek, és újra felhasználódhatnak a perifériás szövetekben, vagy döntően a májban. A koleszterin a májból az epén keresztül ürül. Az enterohepatikus körforgás során a kiválasztott koleszterin kb. 50%-a visszavételeződik. Mivel a szervezet a koleszterint nem tudja lebontani, vagy kiválasztani a vesén keresztül, így a széklettel történő ürítés az egyedüli mód, ahogyan távozhat a szervezetből. *(Jones és mtsai 2004, Goedeke és mtsai 2012, Ikonen 2008)*

4. A statinok

Akira Endo, Japán biokémikus, 1971-ben kezdett kutatni egy humán koleszterin-csökkentő gyógyszer után. Munkásságát követve az első gyógyszerként törzskönyvezett vegyület az *Aspergillus terreus* gombából izolált lovastatin volt, majd 1988-ban Svédországban törzskönyveztették a simvastatint. 1994-ben jelent meg a Merck által támogatott Scandinavian Simvastatin Survival Study, amelyben a kutatók 4444 szívbeteget vizsgáltak, akiknek magas volt a szérum koleszterin-szintje. 5 éves követés során a simvastatint szedők körében nem csak a koleszterin-szint csökkent 35%-al, hanem a szívinfarktusból eredő halálozás esélye is: 42%-al. A markáns eredmények miatt etikátlannak tartották a placebo csoportot kezelés nélkül hagyni, így idő előtt leállították a tanulmányt. A Merck 1995-ben több, mint 1 milliárd \$ jövedelmet ért el a simvastatin eladásából. A koleszterin kutatásáért Nobel-díjat nyert Michael C. Brown és Joseph Goldstein mondta Endo-ról: "The millions of people whose lives will be extended through statin therapy owe it all to Akira Endo." *(Endo 1992, Randomised trial 1994, Simons 2003, Endo 2004, Stossel 2008)*

A statinok szerkezete, hatásmechanizmusa

A statinok összefoglaló név alatt értjük a HMG-CoA reduktáz gátlók családját. Képviselői: atorvastatin, cerivastatin, fluvastatin, lovastatin, mevastatin, pitavastatin, pravastatin, rosuvastatin, simvastatin. A lovastatinhoz szerkezetileg nagyon hasonló a simvastatin és a pravastatin: a természetes vegyület kémiai módosításával hozták létre. A simvastatin és a lovastatin inaktív laktonok: a szervezeten belül metabolizálódnak biológiailag aktív hidroxisav formává. A statinok másik csoportja teljesen mesterséges, és a butiril-csoport helyett egy nagyobb, fluorofenil csoporttal rendelkezik, ami poláris interakciók kialakításával elősegíti a molekula jobb kötődését a HMG-CoA enzimhez: fluvastatin, cerivastatin, atorvastatin, rosuvastatin. (11. ábra) Ezek a vegyületek aktív hidroxisav formával rendelkeznek. A fluvastatin indol gyűrűs szerkezetű. Emellett a statinok lipofil/hidrofil tulajdonsága is befolyásolja a mellékhatások típusát és gyakoriságát. A lipofil statinok (cerivastatin, simvastatin, lovastatin; gyengén lipofil: fluvastatin és atorvastatin) elsősorban vázizomrendszeri, míg a hidrofil statinok (rosuvastatin és pravastatin) májpanaszok kialakulására hajlamosítanak. Emellett a statinok LDL-koleszterin csökkentő hatásának erőssége is befolyásolja a vázizom-eredetű mellékhatások megjelenésének gyakoriságát. (Harangi és mtsai, 2013)

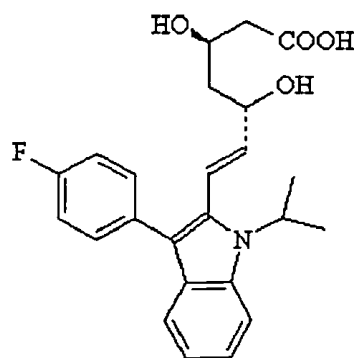


10. ábra: Az 1. és 2. típusú statinok szerkezete. A: Az 1. típusú statinok szerkezeti képlete butiril oldalcsoportot tartalmaz (simvastatin, pravastatin). **B:** A 2. típusú statinok fluorofenil csoporttal rendelkeznek (fluvastatin, atorvastatin, rosuvastatin, és a már forgalomból kivont cerivastatin). (Istvan és mtsa 2001)

A statin család tagjainak fő hatása a szérum koleszterin-szint csökkentése, akár 55%-al. Hatásmechanizmusuk: gátolják a HMG-CoA - mevalonát átalakulást a katalizáló enzim, a HMG-CoA reduktáz kompetitív gátlásával. Ez a sebességmeghatározó lépés a koleszterin bioszintézise során. Az intracelluláris koleszterin-koncentráció csökkenés következtében a

májsejtek fokozzák a sejtfelszíni LDL-receptor expressziót, ami fokozza a vérben keringő LDL felvételét. Ezáltal az LDL (és más, apoB tartalmú lipoproteinek) plazmakoncentrációja csökken. (2019 ESC/EAS guidelines for the management of dyslipidaemias)

Kísérleteink során a statinok családjából a fluvastatint alkalmaztuk. (11. ábra) A fluvastatin a lovastatin szintetikus származéka, 1993-ban kapott FDA engedélyt. 20 és 40 mg-os kapszula és 80 mg-os elnyújtott hatású formája létezik. A kezdő dózis 20 mg/nap, a maximális dózis 80 mg/nap. A gyógyszer hatóanyaga a nátrium-fluvastatin: $C_{24}H_{25}FNO_4 \cdot Na$, molekulatömege 433,46 Da, fehéres-halványsárga hygroscopikus por, jól oldódik vízben, etanolban és metanolban (12 ábra). (Lescol)



11. ábra. A fluvastatin molekulaképlete.

A statinok atheroscleotikus eredetű szív-érrendszeri megbetegedés kialakulását csökkentő hatása – alkalmazási előirat

A statinok gátolják az érlemezés kialakulását. A 2019-es ESC ajánlás a dyslipidaemák kezeléséről alapján a kardiovaszkuláris eredetű megbetegedések primer prevenciójaként 3 mmol/l feletti LDL koleszterin koncentráció esetén életmódi változtatások sikertelensége esetén, míg 4,9 mmol/l felett az életmódváltással egyidőben gyógyszeres intervenció indítását javasoltja (IIa/A szintű evidencia). Szekunder prevenció céljából 1,4 mmol/l feletti LDL koleszterin koncentráció esetén életmódi változtatásokkal együtt javasolt a gyógyszeres intervenció (I. A szintű evidencia). Az első választandó gyógyszer statin; a célértékek eléréséhez szükséges maximálisan tolerálható dózisban. Amennyiben önmagában a statinkezelés nem eredményez megfelelő mértékű LDL koncentráció csökknést, ezetimibe-el történő kiegészítés javasolt. Az ezetimibe gátolja a vékonybélből történő koleszterin felszívódását, ezáltal csökkenti a májba történő koleszterin transzportot. Ennek következtében a májsejtek felszínén az LDL-receptor expresszió fokozódik, így az LDL felvételre kerül a

plazmából. Amennyiben így sem sikerül elérni a célértéket, PCSK-9-inhibitor (Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9) terápiával történő kiegészítés javasolt. A PCSK-9 fehérje az sejtfelszíni LDL receptorhoz kötődve a lizoszómális lebontás elősegítése révén csökkenti az LDL-receptor koncentrációt, következményesen emelve a keringő LDL koncentrációt. A PCSK-9 inhibitor monoklonális antitestek gátolják a keringő fehérje működését. (2019 ESC/EAS guidelines for the management of dyslipidaemias) Cochrane összefoglaló is megerősítette, hogy a statinok primer prevencióban csökkentik az össz-halálozás mellett a főbb kardiovaszkuláris események előfordulását. Becslések szerint a lakosság 10%-a statin-szedő. (Bruckert és mtsai 2005, Goodman és mtsai 2015, Stone és mtsai 2014, Piepoli és mtsai 2016, Taylor és mtsai 2013)

A statinok pleiotrop hatása

A statinok gátolják az érlemezsedés kialakulását, és ezért csak részben felelős a koleszterinszint csökkenés. Bár az LDL koncentráció csökkentés a statinok fő hatása, a kardiovaszkuláris mortalitás csökkenésében fontos szerepet játszik a gyulladáscsökkentő és antioxidáns hatásuk is. Az atherosclerotikus plakkok stabilizációja és az endothel funkció javítása háttérben a gátolt izoprenoid termelés (FPP és GGPP), a prenilált fehérjék mennyiségének csökkenése állhat. A leggyakoribb prenilált fehérjék a G-proteinek közé tartozó kis GTP-ázok. A Ras család alapvetően a sejt-proliferációban játszik szerepet (protoonkogének), a Rho család a sejt-morfológia kialakításában (az aktin citoszkeleton változásait szabályozza), egyéb családok a különböző transzport folyamatokért felelősek. A Rho GTP-ázok és a Rho-asszociált protein kinázok (ROCK) szabályozzák az érfal simaizom-rétegének kalciumion koncentráció változástól független összehúzódását és koszorúér-spasmus kialakulását is indukálhatják. A Rac (a Rho család egyik tagja) egyrészt a citoszkeleton remodellingjéért felelős; emellett fontos szerepe van a reaktív oxigén-gyökök képzésében is. A statinok gátolják a Rac1-mediálta NADPH oxidáz aktivitást, így az angiotenzin II indukálta reaktív oxigén-gyök-képződés gátlása révén megakadályozzák a vasculáris hypertrofia kialakulását simaizomokon és szívizmon. Az érfalban található Rac1 aktivitása összefüggésben áll az érlemezsedéssel, neointima proliferációval, szívizom hypertrófiával és endothel diszfunkcióval. (*Wang és mtsai 2008*)

A statinok immunmoduláns hatása is ismert, és szintén a kis GTP-ázokhoz köthető, a MHC-II-n keresztül. Emellett a statinok gátolják a perifériás mononukleáris sejtek proliferációját, és indukálják az interleukin 4-függő T-helper 2 immunsejtek differenciációját. (*Wang és mtsai*

2008) A fluvastatinnak kimutatott daganat-ellenes hatása is van: pl. hepatocellularis carcinomában gátolja a sejtosztódást, apoptózist indukál. (Paragh és mtsai 2005)

A statinok mellékhatásai, myopátia

A statin-terápia jótékony hatásai mellett nem mentes mellékhatásoktól. Leggyakrabban a különféle izom-problémák fordulnak elő (1-10%), emellett májenzim-emelkedés és metabolikus eltérések, pl. diabetes mellitus fordulhatnak elő még megemlítendő gyakorisággal. (Naci és mtsai 2013) Az általunk is vizsgált vázizom-mellékhatás sokszor a kezelés felfüggesztéséhez vezet: akár a páciensek 75% abbahagyja a statinok szedését a terápia kezdetétől számított 2 éven belül. (Chodick és mtsai 2008, Saxon és mtsai 2016)

Kanadai munkacsoport elemzése szerint a randomizált, kontrollált vizsgálatok (RCT-k) alulbecsülik a statin-kezeléshez köthető izom-fájdalmak megjelenését. Az RCT-k átlagosan 1-5% közé teszik a myalgia megjelenésének valószínűségét, míg megfigyeléses vizsgálatok magasabb, 11-29% közötti értéket jelentettek. Ennek oka egyrészt, hogy a nagy RCT-kenél már a beválogatás során kizárják a panaszos betegeket. Másrészt a diagnosztika is nehezített: az egységes nevezéktan hiánya miatt különféle izomtünetek (myalgia, miopátia, myositis, myonecrosis és rhabdomyolízis) fogalmát különböző munkacsoportok eltérően használják. Emiatt sokáig nem voltak egységes kérdőívek és tesztek a vázizom-mellékhatások szűrésére. (Mancini és mtsai 2011, Saxon és mtsai 2016) Ezt felismerve több munkacsoport is dolgozott ki ajánlást, pl. az amerikai National Lipid Association 2014-ben jelentette meg a Statin myalgia klinikai index score táblázatát. Javaslatuk a nomenklatúra egységesítésére: myalgia bármilyen izom-diszkomfort-érzés CK emelkedés nélkül (fájdalom, izomgörcs, zsibbadás, „influenza-szerű érzés”). A miopátia izomgyengeséget jelent, nem feltétlenül fájdalmas és feltétlenül jár emelkedett CK-val. A myositis izomgyulladás: fájdalmas, nyomásérzékeny izmokkal. A myonecrosis jellemzője a CK emelkedés (szérumban mérve). Klinikai rhabdomyolízis: myoglobulinuriával vagy akut veseelégtelenséggel társuló izomnekrózis. Az eltérő klinikai képek hátterében eltérő patomechanizmus állhat. (Rosenson és mtsai 2014) Az Európai Atherosclerosis Társaság 2015-ös ajánlása más irányba mutat: az összes izom-eredetű tünetet és panaszt „statin-asszociált izom tünetek” összefoglaló névvel javasolt illetni (SAMS), és ehhez a szérumban mért CK értékét rendelik hozzá, együtt hat súlyossági kategóriát képezve. (Stroes 2015) 2014-ben publikálták a nemzetközi konszenzus dokumentumot, mely egy multidiszciplináris szakértői együttműködés keretében jött létre a statin-szedéssel összefüggő miopátia témájában. Szintén egységes elnevezést ajánlanak a

változatos formában megjelenő tüneteknek: statin-szedéssel összefüggő miotoxicitás (SRM), és a szérum-CK emelkedés társításával hoztak létre 7 súlyossági kategóriát, ami egyben etiológiai differenciálást is eredményez. (*Alfirevic és mtsai 2014*)

A statin-indukálta izompanaszok megjelenése dózisfüggő és csoport-hatás: a statin-család minden tagjára jellemző. A statin-miopátia jellemző tünetei: általában szimmetrikus, proximális, és döntően nagy izmokat érintő változatos tünetek (myalgia, miopátia, myositis vagy myonecrosis) emelkedett CK értékkel, melyek időben a statin-kezeléshez köthetőek, a statin kezelés megszüntetésével reverzibilisek és a terápia újraindításakor reprodukálhatóak úgy, hogy közben az izompanaszok lehetséges egyéb oki tényezői ki lettek zárva. (*Rosenson és mtsai 2014*) Elsősorban alsó végtagi panaszok dominálnak: csípő-comb- vagy lábikra tájékon, emellett a hátizom érintettsége gyakori. Időben általában a statin-kezelés megkezdését követően 1 hónapon belül jelentkeznek, de gyakorlatilag bármikor előfordulhatnak. A testmozgás növeli a statin-miopátia kialakulásának valószínűségét, emiatt a statint szedők fizikai aktivitása lecsökkenhet, ami rontja az életminőséget és/vagy a kezelés elhagyásához vezethet. (*Goodman 2015*) A miopátia kialakulásának ismert rizikótényezői az idős kor, máj- vagy vesekárosodás jelenléte. Fibrátok, vagy egyéb, olyan gyógyszerek együttes alkalmazása, amelyek vagy ugyanazon a citokróm P 450 enzimén keresztül metabolizálódnak a májban, vagy gátolják ugyanazt a CYP enzimet, ami a statin metabolizmusát is végzi (fluvastatin esetén a CYP 2C9, többi statin esetén a CYP 3A4), pl. makrolid antibiotikumok, antimikotikumok, cyclosporin és a grapefruit lé, megemelik a statinok plazma-koncentrációját, ezáltal fokozzák a miopátia rizikóját. (*Mancini és mtsai 2016*) Egy esettanulmány alapján ismert például, hogy a krónikus, nagy dózisú grapefruit-lé fogyasztása miatt súlyos statin-asszociált miopátia alakult ki, rhabdomyolízissel (CK: 2640 U/l). (*Dreier és mtsa 2004*). A rhabdomyolízis a statin-kezelés legsúlyosabb és legrettegettebb mellékhatása, potenciálisan életveszélyes. Az izomszövet akut károsodása következtében a sérült izomsejtek alkotói a véráramba kerülnek: a myoglobint akut veseelégtelenséget okozhat, míg a hyperkalaemia a szívizom funkcióját gátolhatja. 2001-ben a cerivastatint kivonták a forgalomból a mellékhatásaként kialakuló rhabdomyolízis, és következményes mortalitás-emelkedés miatt. Cerivastatin mellékhatásaként 10-szer annyi rhabdomyolízist jelentettek, mint a többi statin szedése mellett együttesen. (*Huerta-Alardín és mtsai 2005, Furberg és mtsa 2001*)

A statin-miopátia szövettani jellemzői: mononukleáris sejt infiltráció, myofagocitózis és az izomrostok alak- és méretbeli variabilitása. (*Chucrallah 1992*) Állatmodellen (patkány)

legalább 10 napra volt szükség a statin-kezelés indukálta izom-nekrózis kialakulásához. Mitokondrium károsodás és subsarcolemmalis felhalmozódása után a kontraktilis elemek, az endoplazmatikus retikulum károsodott, majd izomrost nekrosis jelentkezett. Elektronmikroszkóppal a subsarcolemmaris területen figyeltek meg megnagyobbodott, degenerált mitokondriumokat, aberráns myelinoid hurkokkal és sferoidokkal. Szövettanilag szegmentális nekrosis, gyulladós infiltrátum (döntően mononuclearis sejt), megőrzött bazális membrán mellett az elhalt citoplazma felszívódása ábrázolódott. A kezelés felfüggesztésekor regeneráció jelei látszóttak. A vizsgálat során a *m. Soleus*-t nem érintette a nekrosis (döntően I. típusú rostokat tartalmaz és a gyors, glycolitikus II.B rostok alig fordulnak elő benne). Úgy találták, hogy az izomrostok statin-érzékenysége egybevág a metabolikus tulajdonságaikkal: legkevésbé érzékeny az I. típusú rost, növekvő sorrendben követi a II.A., II.D., majd a II.B. típusú izomrost károsodása a leggyakoribb. (*Westwood 2005*) Mohaupt humán vázizom biopsziával a T-tubulus rendszer vacuolizációját azonosította a statin-szedéssel összefüggésben ép sarcolemma mellett. Továbbá a myofibrillumok subsarcolemmalis leválását, és variabilis rostátmérőket detektált fénymikroszkóppal, elektronmikroszkóppal a mitokondriumok megőrizték struktúrájukat. (*Mohaupt és mtsai 2009*)

A statin miopátia patomechanizmusa: lehetséges teóriák:

A statin-kezelés indukálta mitokondrium károsodás és az izomrost-nekrosis mevalonát adásával kivédhető. A sejtmembrán alacsony koleszterin-tartalma megváltoztatja a membrán fluiditását és az ioncsatornák aktivációját, pl. megváltozik a rianodin receptoron keresztül triggerelt Ca^{2+} felszabadulás, károsodik a Ca^{2+} jelátvitel. Azonban a mevalonát-útvonal gátlása nem csak a mevalonát és a koleszterin hiányát idézi elő, hanem egyéb fontos, a koleszterin-szintézis útvonalon lévő molekula képződése is gátolt. A csökkent farnezil-pirofoszfát és geranylgeranyl-pirofoszfát tartalom károsodott sejt-növekedéshez és az autofágia aktiválódásához vezet. Az ubiquinon a mitokondriális elektron-transzport működéséhez szükséges az oxidatív foszforiláció során, szintjének csökkenése károsíthatja az elektron-transzfert az I., III. és II. komplex között. Ismert, hogy a geranylgeranoil adagolás szintén kivédte a statinok myotoxicitását, ez a molekula a koleszterinnek nem prekursora, de az ubiquinonnak igen. Emellett a selenoproteinek termelődése is csökken a mevalonát útvonal gátlásával, melyek ismert anti-inflammatorikus hatással rendelkeznek (a reaktív oxigéngyökökkel szembeni védelem miatt), emellett egyik típusuk elengedhetetlen a pajzsmirigy-hormonok megfelelő működéséhez. A humán genom projekt során több

selenoproteint azonosítottak, többek között a SelN-t is, mely az ER-ben a RyR-al kapcsoltan helyezkedik el és annak megfelelő működéséhez hozzájárul. A SelW hiánya vázizomfunkciókárosodáshoz és kalcium-lerakódáshoz vezet, emellett több kis selenoprotein is található az ER-ben. (Bellinger és mtsai 2009, Moßhammer és mtsai 2014) Mohaupt és munkacsoportja külön vizsgálta a jelenleg is statint szedő és a kezelést felfüggesztett (átlag 12 hét) miopátiás betegek csoportját, és a RyR3 mRNS overexpresszoióját azonosították a statin-szedéssel összefüggésben, mely alapján a kalcium-homeosztázis változását feltételezik lehetséges oki tényezőként. A strukturális eltéréseket nem tudták a CK érték emelkedéséhez társítani, melynek oka szerintük az intakt sarcolemma. Véleményük alapján lehetséges, hogy egy már meglévő strukturális eltérést hoz felszínre a statin-terápia. (Mohaupt és mtsai 2009) Goodman 2015-ben megjelent cikkében patkányokon *in vivo* alkalmazott statin kezelést (simvastatin 80 mg/kg/nap) olyan dózisban, ami a koleszterin-szintet csökkentette, de látványos izomkárosodással vagy CK emelkedéssel nem járt. (Azonban az állatok testtömeg-gyarapodása 20%-kal elmaradt a kontrollhoz képest.) Azt tapasztalta, hogy a statin kezelés mind a *m. Soleus*-on, mind a *m. EDL*-n növeli a myostatin, az atrogin-1 és a MuRF1 (*Muscle-specific RING-finger protein*) mRNS expresszióját. Emellett a *m. EDL*-n az AMP-aktiválta protein-kináz α , az endotheliális- és a neuronális nitrogén-monoxid-szintáz (eNOS, nNOS) fehérje expressziója is emelkedett, és a zsírsav oxidációért felelős β -hidroxiacil-CoA-dehidrogenáz aktivitás csökkent. Azonban a PGC1 α és az általa regulált NRF1 (*Nuclear Respiratory Factor 1*) és Tfam (*mitokondriális transzkripció faktor A*) fehérje expressziója az ő kísérletében nem változott. Korábról ismert volt a statinok PGC1 α csökkentő hatása mind humán, mind patkány vázizomban, ami a mitokondriumok méretének csökkenéséhez vezetett. Az atrogin-1 csökkenti a piruvát-dehidrogenáz komplex aktivitását, így fokozza az izmok glikogén tartalmát. A statinok csökkentik a glükóz oxidációt, ami glükóz intolerancia, inzulin rezisztencia kialakulása mellett a FoxO target géneket aktivál, többek között atrófiáért felelős géneket. A vázizmok lipid-tartalmának emelkedése is vázizom inzulin-rezisztencia kialakulásához vezet. A statinok fokozzák az LDL felvételét a vázizomsejtekbe és a lipoprotein lipáz aktivitást, ez a csökkent zsírsav-oxidációs kapacitással együtt toxikus lipid terheléshez vezet, ami az inzulin-rezisztencia kialakulásán keresztül az atrófiáért felelős gének aktiválódásához vezet. A statinok fokozzák az endothéliumban is az NO-termelést a RhoA geranilgeranilációjának gátlásával. (Stroes és mtsai 2015, Westwood és mtsai 2005, Flint és mtsai 1997, Goodman és mtsai 2015) Más szerzők azt tapasztalták, hogy statin hatásaként a myociták membránjában csökken a koleszterin tartalom (Harper és mtsai 2007), és a HMG-CoA reduktáz gátlása miatt csökken a fehérjék prenilációja, így megváltozik a kis GTP-ázok

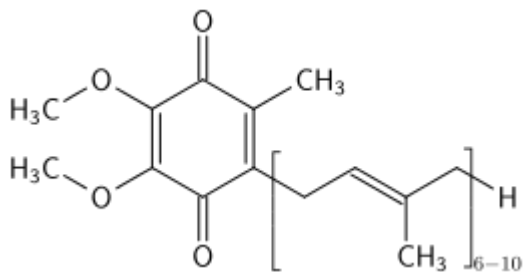
működése is (Wang és mtsai 2008). A foszfolipid kettősrétegek megfelelő, normál koleszterin-szintje fontos tényező abban, hogy meggátolja a nátrium szivárgást (*leaking*) a membránon keresztül, ami által csökken a Na/K pumpa energiafelhasználása, és csökken a sejt ATP-felhasználása (Haines 2001). A sejt felszíni membrán csökkent koleszterin tartalma ATP deplációhoz vezet, ez a kalcium homeosztázisban is változásokat idéz elő. A statinok károsítják a mitokondriumok működését (Sirvent és mtsai 2005) és/vagy koenzim Q10-hiány kialakulásához vezetnek, ami szintén miopátiát okozhat (Harper és mtsa 2007; Ghirlanda és mtsai 1993), mivel ezen állapotok aktiválják az apoptózis kaszkádot (Dirks és mtsa 2006; Kaufmann és mtsai 2006; Kohro és mtsa 2009). Továbbá az ubiquitin/proteoszóma útvonal változásait is összefüggésbe hozták a statin-indukálta miopátia kialakulásával (Buettner és mtsa 2008). Egyelőre nem teljesen tisztázott, hogy milyen molekuláris eltérések vezetnek a statin-asszociálta miopátia kialakulásához, bár vannak ismert farmakológiai tulajdonságok.

Az intracelluláris hatások mellett farmakokinetikai hatásoknak is szerepe van a statin-kezeléshez köthető vázizomkárosodás hátterében. A gyógyszer felszívódást, disztribúciót és kiválasztást a hepatociták és miociták membrán-transzportja és a biotranszformációban bekövetkező változások is befolyásolják. A magasabb statin-koncentráció hozzájárulhat toxikus hatások kialakulásához. GWAS (*genom-wide association studies*) vizsgálattal több SNP-t (*single nucleotid polimorphism*) és haplotípust azonosítottak: OATP (*organic anion transporting polypeptide*), NTCP (*Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide*), P-gp (*ATP dependent transporters P-glycoprotein*), BCRP (*breast cancer resistance protein*), MCT, MRP (*multidrug resistance-associated protein*) génekben. Az OATP-t kódoló SLCO1B1 (*solute carrier organic anion transporter family 1B1*) gén c521C homozigóta variáns jelenléte mellett a miopátia rizikója 17-szeres a vad típushoz képest (Eszélyhányados:16,9, 95% fiducia intervallum: 4,7-61,1). (Moffhammer és mtsai 2014)

Összességében a statinok koleszterin-szint- csökkentő hatása károsodott membrán-integritáshoz vezethet, Q10 koncentrációt csökkentő hatása miatt a mitokondriumokban az oxidatív foszforiláció gátlódik, így csökkenhet a sejtek energia-termelése, és a prenilált fehérjék számának csökkentésén keresztül apoptózis indukció következhet be. Ezen folyamatok mindegyikében döntő részben involvált a kalcium-jelátvitel. (Wang és mtsai 2008, Paragh és mtsai 2005, Saxon és mtsa 2016)

5. Koenzim Q10:

A koenzim Q10 (vagyis ubiquinon) egy 1,4 benzokinon. (12. ábra) Elnevezésében a Q a quinon csoportot jelöli, míg a 10 az izoprenyl alegységek számát adja meg. A Q10 egy zsírban oldódó vitamin, ami majdnem minden eukarióta sejtben megtalálható, döntően a mitokondriumban fordul elő. Az elektron transzport lánc részeként az aerob sejtlegzés fontos eleme, mely a test energia-termelésének 95%-át adó ATP-termelés alapja. A Q10 elektron karrként funkcionál, ami az I. és II. enzim komplexről a III. enzim-komplexhez szállítja az elektronokat. Más molekula nem végzi ezt a feladatot. Antioxidáns hatása is van: a légzési láncban a molekula oxidált és redukált állapota váltakozik. Redukált állapotban az elektronjait gyengén köti, és könnyen leadja más, oxidált molekuláknak. Gátolja pl. a lipid peroxidációt, más antioxidánsokat regenerál (pl. E vitamin). A keringő Q10 gátolja az oxidált LDL képződést, így véd az érlemezés kialakulása ellen. Bioszintézise majdnem minden sejtben zajlik. Mivel az izoprén részek létrehozása a koleszterin képzéssel közös útvonalon zajlik, a HMG-CoA -gátló statinok csökkentik a Q10 szérumszintet (akár 40%-al). A táplálékkal átlagosan 2-3 mg Q10-t veszünk fel naponta, legfontosabb forrás a hús, (szív és máj) és hal. Emellett növényi olajokban, olajos magvakban, zöldségekben (petrezselyem) és az avokádóban fordul elő nagyobb mennyiségben.



12. ábra. Koenzim Q10 szerkezeti képlete.

A koenzim Q10 szerepe a statin-miopátiában:

Mivel a statinok gátolják a HMG-CoA-reduktázt, ezáltal az azonos útvonalon képződő Q10 szintézise is gátolt. Ezért felvetődött oki szerepe a statin-kezelés mellékhatásaként jelentkező izom-panaszok hátterében. Statin kezelés mellett csökkent a Q10 szérumszintje. Több kísérleti tanulmány is született statin-miopátiás betegeken történő Q10 alkalmazásról (Caso és mtsai 2007, Young és mtsai 2007). Azonban ezek eredménye nem egyértelmű, az adatok elemzéséből született tanulmány nem igazolta egyértelműen jótékony hatását, csak,

mint trendet írta le. *(Banach és mtsai 2015)* 2015-ben terveztek egy olyan vizsgálatot, ahová csak igazolt statin miopátiás betegeket válogattak be a kezelési fázisba. Az izomfájdalmakat jelző betegeknél csak 36%-ban tudták igazolni a statin-eredetet. A vizsgálatban 600 mg/nap CoQ10-t használtak, ami hatékonyan emelte a szérumban a CoQ10 koncentrációt, és ellensúlyozta a statin-kezelés általi csökkentést is. Azonban így sem találták protektívnek az izompanaszok mérséklésében. *(Taylor és mtsai 2015)*

Az USA FDA-ban, ahogyan Magyarországon is, gyógyszerként nincs törzskönyvezve, csak táplálék-kiegészítő.

II. Célkitűzések

PhD munkám során célom volt a statin-kezelés vázizom-károsító hatásának modellezése, mechanizmusának vizsgálata.

Mivel a statin kezelést alapvetően hypercholesterinaemiás betegek szedik, szeretttük volna e tényező hatását is vizsgálni. Ezért első lépésben célunk volt egy olyan állatmodell kidolgozása, amely biztonságosan reprodukálja ezt a humán állapotot.

Ezt követően terveztük vizsgálni mind kontroll körülmények között, mind hypercholesterinaemia mellett a statin-kezelés vázizmot érintő hatását. A miopátia jelenlétét funkcionális vizsgálatokkal, izomerő-mérésekkel kívántuk bizonyítani, illetőleg fennállása esetén jellemezni. Azt feltételeztük, hogy a gyors rostokban gazdag izmok, eltérő anyagcseréjük miatt, eltérő módon reagálnak a statin alkalmazására is. Ezért mind gyors, mind lassú típusú izmon elvégeztük funkcionális méréseinket.

Mivel a szakirodalomban sok, diverz teória létezik a miopátia kialakulására, mi egy közös lépés vizsgálatát terveztük: a kalcium-homeosztázis változása minden elméletben szerepet játszik. A kalcium az intracelluláris jelátviteli útvonalak mellett a vázizom elektro-mechanikai kapcsolatában is alapvető szerepet játszik. Az izomroston belüli kalciumkoncentráció változásait ratiometrikus fluoreszcens festék segítségével terveztük kimutatni. A statin elektromechanikai kapcsolatra kifejtett feltételezett hatásának vizsgálata céljából elemi kalciumfelszabadulási eseményeket rögzítettünk, majd azok paramétereit (időbeliségét, térbeliségét, intenzitását) elemeztük.

Irodalmi adatok szólnak a koenzim Q10 protektív hatásáról statin-miopátia esetén. Szerettük volna megvizsgálni, hogy a Q10 valóban véd-e a statin-kezelés vázizmot érintő melléhatásai ellen? Vajon a Q10 koncentráció csökkenése szerepet játszik-e a miopátia kialakulásában? Ezért a kísérleteinket, mind a funkcionális méréseket, mind az elemi események vizsgálatát, Q10 jelenlétében is elvégeztük.

Hipotézisünk az volt, hogy a statinkezelés megváltoztatja az intracelluláris kalcium-szignalizációs útvonal jelátvitelét. Emellett feltételeztük, hogy a Q10 képes ellensúlyozni a statin által kiváltott változásokat.

III. Anyagok és módszerek

1. Állatmodell

Kísérleteinket felnőtt nőstény Fisher patkányokon végeztük. A nemi különbségek vázizomrendszerre kifejtett hatásának kiküszöbölése érdekében kizárólag azonos nemű állatokkal dolgoztunk. Emellett az életkoruk (2 hónap) is azonos volt a kísérlet kezdetén, hogy az izmok természetes öregedése ne befolyásolja a méréseinket. Az állatok súlya egy súlytartományon belül (100-150 g között) volt a vizsgálatunk megkezdése előtt, hogy a méretből adódó különbségek, amik az izomtömegre is hatással vannak, ne befolyásolhassák a mérésünk eredményét.

Az állatok gondozásában és feláldozása során követtük a Debreceni Egyetem Etikai Kódexét, mely az Európai Unió irányelveinek megfelelő szabályozást biztosít. Az etikai engedély száma: 2/2006.DE MÁB. Az állatok elhelyezése speciális állatházban, hagyományos ketrecekben történt, állandó szobahőmérsékleten.

A kezelés menete

Az állatokat különböző, előre elkészített, kevert diéták segítségével kezeltük, melyek alapja a standard rágcsálótáp volt. A diéták pontos összetétele a 3. táblázatban látható. A kontroll táp mellett fluvastatin-tartalmú diétát alkalmaztunk, és minden kezelést speciális, hypercholesterinaemiát indukáló körülmények között is elvégeztünk; emellett koenzim-Q10 kiegészítést is alkalmaztunk minden egyes diéta-típus esetén. Mindazonáltal szükség volt néhány speciális kontroll csoport felállítására is. A különféle diéták részletesen alább kerülnek bemutatásra (3. táblázat). A tápkeverék előállítását a Charles River magyarországi laboratóriumában végezték erre a célra kifejlesztett táp-keverő berendezés segítségével. A kísérletünk során az állatok az ételhez és a vízhez ad libitum hozzáféréssel rendelkeztek. A kezelés hossza minimum 21 nap volt. A kezelés alatt az állatok tömegét és az elfogyasztott táp mennyiségét napi rendszerességgel mértük. A kontroll állatok standard rágcsálótápot kaptak. A különböző kezelési csoportok megkülönböztetésére a 3. táblázatban használt rövidítéseket használjuk.

Diéta jelölése	Összetevők:	koleszterin mg/kg/nap	kolsav mg/kg/nap	tiouracyl mg/kg/nap	fluvastatin mg/kg/nap	koenzimQ10 mg/kg/nap
K	standard rágcsálótáp	-	-	-	-	-
HC	standard rágcsálótáp	5	1	1	-	-
HC+S	standard rágcsálótáp	5	1	1	6,4	-
HC+S+Q10	standard rágcsálótáp	5	1	1	6,4	10
S	standard rágcsálótáp	-	-	-	6,4	-
Q10	standard rágcsálótáp	-	-	-	-	10
S+Q10	standard rágcsálótáp	-	-	-	6,4	10
TU	standard rágcsálótáp	-	-	1	-	-

3. táblázat. Az általunk használt különböző diéták összetétele.

K: kontroll, HC: hypercholesterinaemiát indukáló diétás csoport, HC+S: hypercholesterinaemiás körülmények között alkalmazott fluvastatin kezelt csoport, HC+S+Q10: hypercholesterinaemias körülmények között alkalmazott fluvastatin- és koenzim-Q10 kezelt csoport, S: fluvastatinnal kezelt diétás csoport, Q10: Koenzim-Q10-el kezelt diétás csoport, S+Q10: fluvastatinnal és koenzim Q10-el kezelt diétás csoport, TU: tiouracyl tartalmú diéta, amely kontrollként funkcionál.

A hyperkoleszterinaemiás állatmodell

Mivel az általunk vizsgálni kívánt gyógyszert magas koleszterin-szinttel rendelkező emberek szedik, ezért modellezni kívántuk ezt az állapotot az állatkísérletünk során.

A rágcsálók össz-koleszterin szintje a szérumban kontroll körülmények között alacsony, a humán értékekkel összevetve nagyságrendileg az ember össz-koleszterin-szintjének a negyede. Emellett a lipoproteinekhez való kötődése is eltér az emberétől: a vezető lipoprotein a HDL, ami a legjelentősebb frakció, a lipidek közel 90%-a ebben a formában van jelen a keringésükben. A vérplazma LDL koncentrációja így nagyon alacsony, szinte alig pár százalékban kimutatható. Döntően ennek köszönhető, hogy érlemeszesedésre nem hajlamosak. Ezért munkánk során olyan módszert dolgoztunk ki, amely a diéta módosításával

jelentősen megemelte a rágcsálók plazmában mért össz-koleszterin-szintjét a humán viszonyokkal összevethető értékekre. Emellett az általunk alkalmazott speciális étrend a lipoproteinek arányát is a humán viszonyokat reprezentáló módon változtatta meg.

Önmagában a zsírdús vagy koleszterindús táplálék nem emeli meg jelentősen a patkányok össz-koleszterin koncentrációját a vérplazmában, ezért egyidejű, kiegészítő kezelést is alkalmaztunk.

A hypercholesterinaemiás diéta (HC) alapvetően magas koleszterin bevitelen alapult. A rágcsálók esetében a fölös mennyiségű koleszterin nem szívódik fel, így védve őket a hypercholesterinaemia hatásától. A hypercholesterinaemias állatmodell biztosítása érdekében kolsavval egészítettük ki a diétát. A kolsav lehetővé tette a fölös koleszterin tápcsatornából történő felszívását. Mindazonáltal a felszívódás fokozása sem eredményezett számunkra elfogadható mértékű, kellően magas koleszterin-koncentráció emelkedést a szérumban. Ezért használtunk tiouracylt is a még markánsabb szérum-koleszterin-szint emelés céljából. A tiouracyl azonban nem a tápcsatornán keresztül, hanem attól teljesen eltérő módon járul hozzá a lipidek koncentrációjának emeléséhez: gátolja a pajzsmirigy működését, tehát pajzsmirigy-alulműködéshez vezet, ami hormonálisan emeli a szérumban keringő koleszterin koncentrációját. Így összességében sikerült kellően magas koleszterin-szintet elérni a kezelt patkányoknál. Mivel azonban a csökkent pajzsmirigyműködésnek ismert a vázizom-funkciót érintő negatív hatása, emiatt szükségesnek láttuk létrehozni egy tiouracyllal kezelt kontroll csoportot is (TU). Ily módon a hypothyreosis esteleges vázizom-károsító hatását ki tudtuk szűrni és el tudtuk különíteni a statin-kezelés következtében esetlegesen észlelt eltérésektől. A hypercholesterinaemiát okozó diéták esetében kontroll csoportként minden esetben ezt, a tiouracyl csoportot használtuk az eredményeink összehasonlításakor, tehát ez esetben a *kontroll* megnevezés erre a kezelési módra utal. (DeSesso és mtsa 2001, Suckow és mtsai 2006, Giknis és mtsa 2008, Faqui 2013)

A kezelésre használt gyógyszerek dózisa

A statinok csoportjából a fluvastatint alkalmaztunk kísérleteink során. Hatásereje közepes, szervezeten belüli további metabolizáció nem szükséges az aktív molekula kialakulásához. A statin hatását mind önmagában alkalmazva, mind a humán alkalmazást jobban tükröző hypercholesterinaemiás állapot mellett megvizsgáltuk. A tiszta statinhatás megismerését azért

is tartottuk fontosnak, hogy kontrollként alkalmazhassuk a HC+S tartalmú kezelések mellett észlelt hatásokhoz.

A fluvastatin humán alkalmazása során a betegek többségénél használt terápiás dózis 20 vagy 40 mg/nap, a maximális alkalmazható dózis 80 mg/nap. Egy átlagos felnőttél 70 kg testtömeggel számolva, az alkalmazott dózisok 0,29 mg/kg/nap illetve 0,57 mg/kg/napnak adódnak, a maximális dózis 1,14 mg/kg/napnak felel meg. Az általunk használt gyógyszer-dózis a humán maximális dózis kb. ötszörösének felel meg. A választott dózistól (6,4 mg/kg/nap) a mellékhatások számának emelkedését vártuk. Azonban nem szerettünk volna olyan toxikus gyógyszer-koncentrációt létrehozni, ami olyan kiugróan magas, hogy humán viszonylatban való összehasonlításra nem ad alapot.

A koenzim Q10 dózisát szintén úgy határoztuk meg, hogy a humán dózist kissé meghaladja. Statin miopátia kivédésére 100-600 mg közötti napi dózisokat használtak eddig megjelent tanulmányokban, ami 1,4-8,5 mg/kg/napnak felel meg. Az irodalmi adatok szerint a 600 mg/nap dózis teljes egészében kompenzálta a statin-kezelés következtében létrejövő Q10 szérum-koncentráció csökkenést. Mi 10 mg/kg/nap mennyiségben alkalmaztunk a kísérleti állatainkon.

A kezelés leteltét követő protokoll

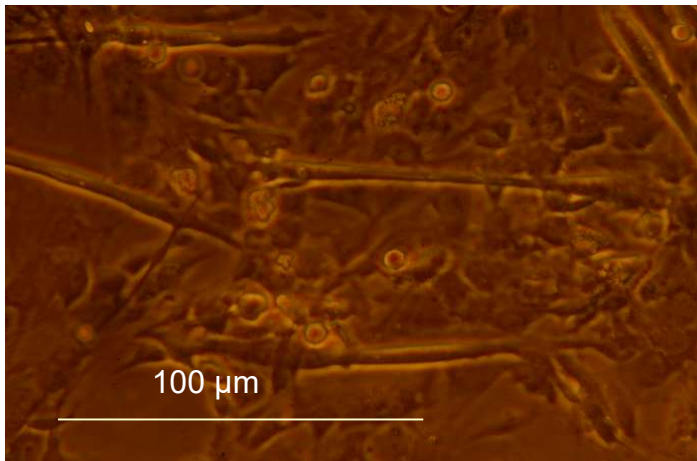
A kezelési idő letelte után az állatok pentobarbitál anesztéziában részesültek (27 mg/kg). Az általunk használt dózis anaesthesiát okozott, majd exsanguinatio következett: a hasüreg megnyitása után az aorta abdominalis került kanülálásra 23 G x 1 ¼", ISO 6009 színekód szerint kék kónuszú tű segítségével (átmérője 0,6 mm, hossza 30 mm, rövid metszlappal). Az eszköz steril volt, nem pirogén, nem toxikus. Ily módon (fecskendő segítségével) először min. 5 ml vérmintát gyűjtöttünk laboratóriumi kémiai analízis céljából. A mintát a rutin labordiagnostikában használt vérvételi csőbe injektáltuk. Az elveszített vérmennyiség hypovolaemiás cardiogen sokkot eredményezett, ami az állat pusztulását jelentette.

Ekkor azonnal eltávolításra került a mellső végtagból a *m. flexor digitorum brevis* (FDB), *m. extensor digitorum communis* (EDC), a hátsó végtagból a *m. extensor digitorum longus* (EDL) és a *m. soleus* (Sol). Az izmok további feldolgozása az elvégzendő kísérlet milyenségétől függött, leírását a következő pontokban a kísérletek bemutatásakor adjuk meg.

Egyes állatok pentobarbital anesztéziát és a vérminta begyűjtését követően patológiai feldolgozásra kerültek, ilyen esetekben értékelésre került az állatok post mortem súlya, az általunk vizsgált izmok, a máj és a szív tömege, részletesen lásd később.

2. Primer vázizom sejt-kultúra

A primer vázizom tenyészet létrehozása céljából 3-7 napos Wistar patkányokat áldoztunk a DE Állat-Etikai Engedélyének megfelelően. Az eutanáziát követően a hátsó végtagból a *m. quadriceps femoris*, a *m. soleus*, és a *m. gastrocnaemius* került eltávolításra. Mechanikai dissectiot követően kalcium- és magnéziummentes foszfát puffer oldatban enzimátikus emésztést végeztünk 0,75 mg/ml koncentrációjú 2. típusú kollagenázzal (Sigma, St. Louis, MO, USA) és 1 mg/ml koncentrációjú tripszinnel (Difco, Detroit, MI, USA). Filtrációt és centrifugálást követően a disszociált sejteket szuszpendáltuk 15% FBS-tartalmú HAM F12 táptalajjal (Sigma) a sejt-proliferáció elősegítése céljából. A tápláló médium 2,5 mg/ml glukózt, 0,3 mg/ml glutamátot, 1,2 mg/ml NaHCO₃-t tartalmazott. A felülfertőződés elkerülése végett kombinált antibiotikus és antimikotikus kezelést alkalmaztunk, amely a kórokozók széles spektruma ellen hatásos. Az általunk használt szerek a következők voltak: 50 U/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin és 1,25 µg/ml fungizon. A szélesztést 32 mm átmérőjű, 0,07 mm vastag steril, üveg fedőlemezen végeztük (Biophysical Technologies, Sparks, MD, USA). A sejt-kultúrát 37°C-n és 5% légköri CO₂-tartalmú termosztátban inkubáltuk 24 órán keresztül. A tenyésztés sikerességét vizuális kontroll segítségével ellenőriztük: az inkubációs periódus leteltét követően fénymikroszkóp segítségével meggyőződünk arról, hogy vannak sejtek minden tárgylemezen és a sejtek morfológiája megfelelő. Ezt követően a primer sejt-kultúrákon random módon két kezelési csoportot hozunk létre: a fluvastatinnal kezelt és a kontroll csoportot. A kontroll sejteket 5% lószérumot tartalmazó DMEM (Sigma) differenciáló tápoldatba helyeztük. A statin-kezelt csoport esetén szintén ehhez a differenciáló médiumhoz fluvastatint is adtunk 10 nM koncentrációban, majd tovább inkubáltuk a két csoportot 37 °C-n, 5% CO₂ mellett még legalább 48 órán keresztül (13. ábra).



13. ábra: Primer vázizom sejt-kultúra fényképe. Láthatóak a satellita sejtek, myoblastok és a többmagvú myotubulusok. Tenyésztési idő: 72 óra. (saját anyag)

3. Sejtproliferáció és -differenciáció vizsgálata

A primer vázizom tenyészeteken a szélesztést követő 24, 48 és 72 óra elteltével fényképeket rögzítettünk egy inverz fénymikroszkóphoz csatlakoztatott Canon EOS-300D (Canon Corp., Japan) digitális, egy objektíves tükörreflexes fényképezőgép segítségével. Az első, 24 óránál rögzített képsorozat azonos tenyésztési körülmények mellett készült mindkét csoportban. Ebben az időpontban alkalmaztuk a különböző kezeléseket, így minden egyes sejt-kultúránál volt egy saját viszonyítási alap a kezelést megelőző állapotról (önkontroll). Minden alkalommal öt egymástól független látóteret rögzítettünk naponta, sejt-kultúránként. A látóterek kiválasztása az üveg fedőlemezek egy bizonyos séma szerint történt, fentről lefelé és mindkét oldal irányába, minden alkalommal és minden tenyészetben ugyanolyan sorrendben. Így igyekeztünk elkerülni a fedőlemez széli és középső része között meglévő denzitás-különbségből adódó torzítás lehetőségét, mivel ily módon minden fedőlemezen azonos arányban kerültek rögzítésre a hipotetikusán különböző denzitású középső és széli területek. A rögzített képeken manuálisan megjelöltük a myogen magokat, elkülönítve a nem izom-eredetű sejt-magoktól. Azonosítottuk a többmagvú sejteket is, így morfológiai méréseket is végezhetünk a képeken. A tenyésztési idő függvényében meghatároztuk a myogen magok abszolút számának alakulását, amiből a tenyészet fejlettségére következtethetünk. A többmagvú izomsejtek jelenléte az izomszövet differenciálódásának érettebb stádiumát jellemzi, és minél nagyobb a többmagvú sejtek aránya, illetőleg minél magasabb az egy izomsejtben lévő magok száma, annál érettebb a tenyészet. Ezért elemzésre került az egy izomsejten belüli átlagos magszám és a fúziós index is: ami egyszerűen a többmagvú sejtekben lévő myogen magok számát viszonyítja az egymagvú sejtekéhez.

Emellett a fentebb említettek közül logikusan következik, hogy a többmagvú sejtek arányát is megvizsgáltuk a mononuclearis sejtekhez viszonyítva. Így a különböző fejlettségi szintű izomsejtek arányából a statinkezelés és/vagy Q10 kezelés myogenezist, sejtproliferációt és differenciációt érintő hatásáról tudunk következtetést levonni (Cseri és mtsai 2002).

4. A lipidek és a kreatin-kináz enzim vizsgálata a vérszérumban

A kezelt Fisher patkányok szakrifikációját követően az *aorta abdominalis* punctioja során gyűjtött vér-mintákat (5 ml) fecskendő segítségével vettük le és olyan, alvadásgátlóval ellátott kémcsőbe gyűjtöttük, amelyek a rutin klinikai kémiai vizsgálatok során használatosak. A mintákat 30 percen belül elszállítottuk a Debreceni Egyetem Klinikai Központ Laboratóriumi Medicina Intézetébe. Az itt használatos standardizált módszerekkel, és rutin diagnosztikában használatos automata berendezések segítségével határoztuk meg a szérum koleszterin-szintet, a hypercholesterinaemiás és/vagy statin-diéta sikerességének igazolása végett. A lipidek közül az össz-koleszterin mellett mértük az atherogen LDL és az anti-atherogen HDL koleszterin szérum-koncentrációját is, és a triglicerid-koncentrációt is. A miopátia súlyosságának monitorozásának céljából a klinikai gyakorlathoz hasonlóan a szérum CK értéket is detektáltuk (Thomas 1992, Fridewald és mtsai 1972).

5. Patológiai, szövettani vizsgálatok

A különböző diétával kezelt Fisher patkányok patológiai feldolgozása során először az állattetemek makroszkópos leírása történt meg, majd ezt követően sectiona került sor. Rögzítésre került az állatok post mortem tömege. Sectio során eltávolításra került a szív, a máj, a vese és az EDL és Sol izmok, majd a szerv-tömegek is mérésre kerültek, és ezt követően a fent említett szervek további feldolgozásra kerültek szövettani analízis céljából.

A szövettani metszetek készítése során a fixálás 8%-os formalin pufferrel történt, 24 órán keresztül. A beágyazás automata segítségével (Shandon pathcenter, Thermo-Shandon, USA) történt, és parafin viaszt használtunk a művelethez. A beágyazást követően mikrotommal 4 µm vastagságú szeleteket készítettünk a szervekről, amiket tárgylemezre való rögzítést követően hematoxilin-eozinnal festettünk. Ezt követően az elkészült szövettani metszeteket LEICA DM 2500 mikroszkóppal vizsgáltuk, és a képeket LEICA DFC 420 típusú kamera segítségével rögzítettük (Leica Microsystems, Germany). Az így készült képeken a különböző diétás csoportba tartozó állatok izmainak átmérőit határoztuk meg egy, a mikroszkóphoz

tartozó szoftver (LEICA Application Suite V3) segítségével. Az izmokban emellett miopátia jeleit kerestük. A vesékben vese-elégtelenségre utaló jeleket, míg a májban a magas koleszterin-szint következményét, pl. a zsíros degeneráció megjelenését kerestük. A munka során a Kenézy Kórház Pathológia Osztálya segített műszerparkjával és szakértelmével.

6. Az izmok kontrakciós erejének vizsgálata

Mivel a gyors és lassú izmok rostösszetétele eltérő, és irodalmi adatok alapján ismert, hogy a statin-indukálta miopátia mértéke eltérő lehet a különböző izomrost-típusok esetén, ezért a kontrakciós erő mérését a patkányok gyors típusú, EDL és lassú, Sol izmain egyaránt elvégeztük.

Az állatok szakifikációját követően kiperaráltuk az EDL és Sol izmokat. Ezt követően azonnal a kísérleti kamrába helyeztük az izmokat és a vitalitás fenntartása érdekében folyamatosan Krebs oldattal perfundáltuk 10 ml/perc sebességgel. A Krebs oldat az alábbi összetevőkből állt: 135 mM NaCl, 5 mM KCl, CaCl₂ 2,5 mM CaCl₂, 1 mM MgSO₄, 10 mM HEPES, 10 mM glukóz, 10 mM NaHCO₃; pH 7,2; az oldat hőmérséklete 23°C volt. A kísérleti kamra légtartalma 95% O₂ és 5% CO₂ volt, hőmérséklete 23°C.

Az izmok egyik végét fixen egy fém rúdhoz rögzítettük, míg a másik vége egy kapacitív mechanoelektromos transzducerhez kapcsolódott. Ezt követően két platina elektródot érintettünk a méréshez használt izomhoz, elektromos ingerelés céljából (14. ábra).

A vázizmok nyugalmi hossza *in vivo* anatómiailag olyan, hogy az izomrostok kissé megnyújtott állapotban vannak, ezáltal passzív feszülésük van. Ez a vázizomban található rugalmas elemeknek köszönhető. Az aktív feszülés az izomkontrakció következtében bekövetkező feszülés-növekedés, amiből megkapjuk a keresztmetszetre vonatkoztatott izomerő nagyságát, amit mi is mértünk munkánk során. A hossz-feszülés összefüggés értelmében a vázizomrostok hosszát külsőleg változtatva változik a kontrakciós erő nagysága is, döntően azért, mert változik az aktin és a miozin molekulák átfedő része, ezáltal változik a keresztidák száma. A kontrakciós erő maximuma 2 µm-es sarcomerhossznál található, alatta és felette is kisebb. Ezért kísérletünk során az izmok passzív feszülését addig növeltük a transzducer segítségével, amíg maximális izomerő-választ kaptunk. Ezután 60 percig hagytuk, hogy a rendszer egyensúlyba kerüljön, majd méréseinket e mellett a rögzített hossz (és passzív előfeszített állapot) mellett végeztük.

Első lépésben az egyedi rángásokat (twitch) vizsgáltuk: 2 secundumonként végeztünk elektromos ingerlést. Az egyedi rángásokat rövid (2 ms hosszú), supramaximális ingerléssel váltottuk ki. Legalább 10 rángást vizsgáltunk minden izmon. Az izom rövidülését a transzducer feszülés-változássá konvertálta, így került rögzítésre az izomerő értéke. Az adatokat 2 kHz frekvenciával digitalizáltuk (Digidata 1200 A/D kártyán rögzítettük és Axotape szoftver segítségével tároltuk, Axon Instrumentes, Foster City, USA). Az egyes erő-tranziensek amplitúdójának variabilitása 3% alatt volt egy sorozaton belül. A tranziensek amplitúdójának átlaga az adott izomra nézve jellegzetes volt.

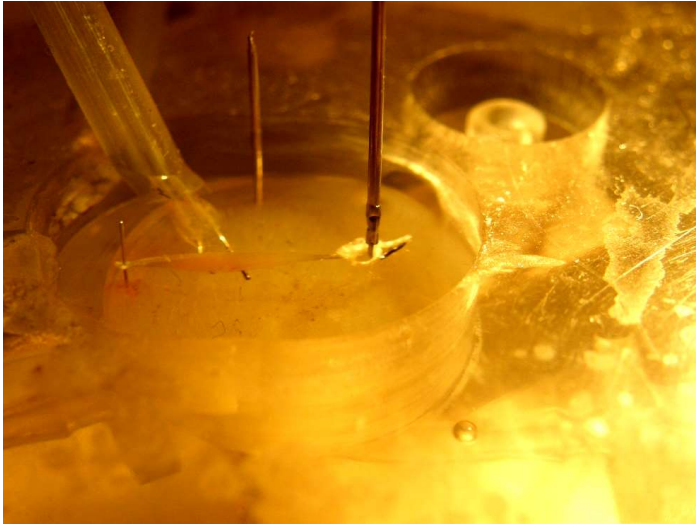
Majd következő lépésben az izmokat tetanizáltuk: sorozatingerlést alkalmaztunk olyan frekvenciával, hogy a következő kontrakció kezdete megelőzze az előző kontrakció maximumát, így az egyes rángások már nem voltak elkülöníthetőek (komplett tetanusz). Az izomrostok maximális ereje, vagyis feszülése az izometriás komplett tetanusz nagyságával jellemezhető. (Izometriás kontrakció esetében az izom hossza nem változik, csak a feszülése nő.) A tetanusz kiváltásakor Ranatuga módszere alapján jártunk el: EDL izmok esetében 200 Hz frekvenciával alkalmaztunk elektromos impulzus-sorozatot 200 ms időtartamon keresztül, és 100 Hz frekvenciával ingereltünk 300 ms időtartamig Sol izmok esetében. Az adatrögzítés és tárolás módja azonos volt, mint a twitch kiváltásakor.

Az egyedi rángások (twitch) és a tetanusz időtartamát (duration) a tranziens kezdetétől a maximális erő 90%-os relaxációjáig eltelt időben határoztuk meg.

A kontrakciók (twitch vagy tetanusz) időbeli lefolyásának jellemzésére használtuk továbbá a tranziens csúcsának eléréséhez szükséges idő: a TTP értékét is, melyet a tranziens kezdetétől a maximális amplitúdó eléréséhez szükséges időtartamban határoztunk meg.

Az izmok fáradásának mérésekor 150 tetanuszt generáltunk egymás után, 2 s-os időeltérésekkel. Az izom fáradásának mértékét úgy kvantifikáltuk, hogy az egyes tetanuszok amplitúdóját az adott sorozatban lévő első tetanusz amplitúdójára normalizáltuk.

A motoros egység (egy neuron és az általa beidegzett izomrostok egysége) jellemezhető az egyszeri izom-összehúzóds során létrejövő feszülés és a tetanusz során elért maximális feszülés arányával (twitch/tetanusz arány). Ismert, hogy különbség van a lassú és a gyors motoros egységek között: a lassú motoros egységek twitch/tetanusz aránya alacsonyabb. Ezért ezt az indikátort is használtuk a különböző diétás kezelések (statin, Q10, stb.) hatásának megítélésre (*Celichowski és mtsa 1993, Oddoux és mtsai 2009, Ranatunga 1982*), (14. ábra).



14. ábra: A kontrakciós erő méréséhez használt elrendezés. *Az izom egyik végén a kisméretű fémrúdhoz történő rögzítés, a másik végén a transzducer látható. Az izom hasánál az ingerléshez használt két platina elektród látszik. Az egész elrendezés Krebs oldattal töltött mérőkádban foglal helyet. (munkacsoportunk által készített fotó)*

7. Izolált vázizomrostok preparálása

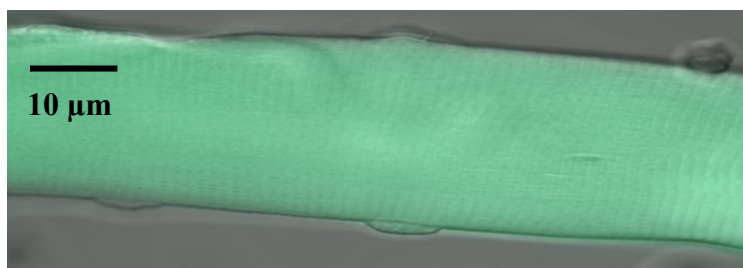
A különböző diétával kezelt Fisher patkányokból a nyugalmi Ca^{2+} -koncentráció-mérésekhez a mellső végtagi EDC-t preparáltuk ki, az elemi események méréséhez az FDB-t. Az izmokat azonnal módosított Krebs oldatba helyeztük (összetétele: 145 mM NaCl, 2,5 mM CaCl_2 , 1 mM MgSO_4 , 10 mM HEPES, 10 mM glukóz, 10% FCS, pH 7,2; 23°C), és preparáló ollóval 3 nagyobb részre vágtuk. Ezt követően 4% FCS tartalmú DMEM-re cseréltük az oldatot, amely 1,25 mg/l Amphotericin B-t, 50000 NE/l Penicillint és 50 mg/l Streptomycint is tartalmazott, és az izomdarabokat 90 percig tartó enzimatis emésztésnek tettük ki, mely a kötőszöveti elemeket elbontotta. E célból I. típusú kollagenázt (Sigma) alkalmazunk 1 mg/ml koncentrációban, és 37°C-n, rázva inkubáltuk. Ennek hatására a fasciák felbomlottak és az izomszövet disszociált. A kollagenáz tartalmú oldat eltávolítása után Ca^{2+} -mentes, 10% FCS tartalmú Krebs oldattal mosást alkalmaztunk, majd ebben az oldatban óvatos triturálást végeztünk, hogy egyedi izomrostokat kapjunk. A mechanikai behatást követően a rostokat minimum 20 percig pihentettük 6-8 °C-n a módosított Krebs oldatban. Ezt követően vizuális kontroll segítségével (CK2 inverz mikroszkóp, Olympus, Tokyo, Japán, 100x nagyítás) kiválogattuk azokat a rostokat, amik intaktnak ábrázolódtak és membrán-károsodás jele nem volt észlelhető, majd üveg kapilláris segítségével óvatosan fürdetőkádba helyeztük azokat a mérés előkészítése céljából.

8. Nyugalmi intracelluláris kalcium-koncentráció meghatározása

A nyugalmi intracelluláris kalcium-koncentrációt meghatároztuk mind a kezelt állatokból izolált vázizom-rostokon (15. ábra), mind a primer tenyészetből származó vázizomsejteken is.

Az izolált rostok és a tenyésztett sejtek fluoreszcens jelölése azonos módon zajlott. A mintát 2 ml normál HEPES-Tyrode (nTyr) oldatba helyeztük (137 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 0,5 mM MgCl₂, 1,8 mM CaCl₂, 11,8 mM HEPES-NaOH, 1 g/l glükóz, pH=7,4) és 5 μM Fura-2 AM (acetoxi-metilészter) kalcium-érzékeny fluoreszcens festékekkel feltöltést végeztük. Az AM forma átjut a sejtmembránon és a sejten belül intracelluláris észterázok lehasítják az acetoxi-metilésztert a Fura-2 molekuláról, szabaddá téve a ratiometrikus kalcium-indikátort. Az extracelluláris acetilkolin-észteráz enzim gátlása céljából 150 nM neostigmint alkalmaztunk (Stigmosan) az oldatban, így módon előzve meg, hogy a festék a sejtekbe/rostokba jutás előtt aktívvá váljon. A töltést 37°C-n, 5% CO₂ mellett, 90 percig végeztük, majd a maradék Fura-2 festék eltávolítása céljából lemosást alkalmaztunk.

A kalciumot kötött és nem kötött Fura-2 festék abszorpciós spektruma eltér egymástól (ratiometrikus), ezért a két külön hullámhosszon váltakozva gerjesztett (340 és 380 nm) sejtek vagy rostok emissziójának arányából a minta kalciumion-koncentrációja kiszámolható.



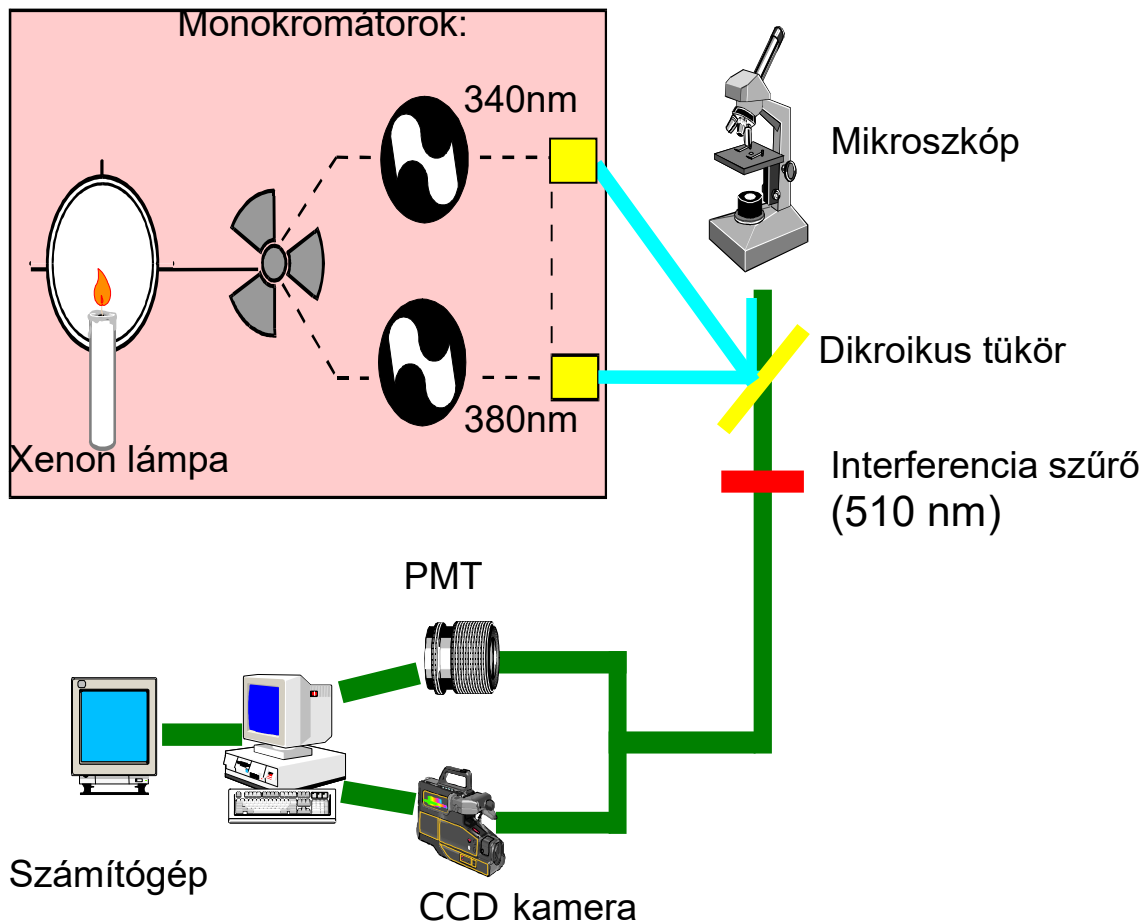
15. ábra: Fluoreszcens festékekkel feltöltött izolált vázizomrost konfokális mikroszkópos képe. Látható a harántcsíkoltat és a sejtmagok a széleken. (saját anyag)

A váltakozó gerjesztést kettős monokromátorral végeztük (Photon Technology International DeltaScan™ Piscataway, NJ, USA). A berendezés (16. ábra) egyrészt egy Xenon lámpából áll, melynek fényét egy forgótükrös sugárosztó két nyalábra osztja. A két sugárnyaláb egy-egy monokromátoron halad át, melynek eredményeként egy 340 és egy 380 nm hullámhosszúságú fénynyaláb keletkezik. A két nyaláb optikai szálon keresztül vezetődik tovább, majd egy csatoló egység után egy dikroikus tükör irányítja a 304/380 nm hullámhosszú fénysugarakat a tárgyasztalon lévő sejtekig/rostokig. A festékekkel feltöltött minta tárgylemezét perfúziós kádba helyeztük, melyet nTyr oldattal töltöttünk fel, és a

perfúzió során szintén ezt az oldatot használtuk. Az áramlás balról jobbra történt, perisztaltikus pumpa segítségével (Econo-pumpTM System), jobb oldali elszívással (külső perfúzió, 3 ml/min). A mérést inverz fluoreszcens mikroszkóppal (Diaphot Nikon, Tokyo, Japan) végeztük, 40x olaj-immériós objektív segítségével. Az időben váltakozva történő kettős gerjesztés eredményeképpen létrejövő emittált fényt fotoelektron-sokszorozó segítségével, interferencia szűrővel, 510 nm-en detektáltuk (16. ábra). A jeleket 10 Hz frekvenciával regisztráltuk. A háttér fluoreszcencia meghatározása a tárgylemez sejtektől/rostoktól mentes helyén történt, ami a mérés során automatikusan levonásra került a fluoreszcencia értékekből. A mért fluoreszcencia értékekből a kalcium koncentráció számításához Grynkiewicz és mtsai egyenletét használtuk:

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

ahol a K_d a festék disszociációs állandója, az R az általunk mért fluoreszcencia értékek hányadosa: $R = F_{340}/F_{380}$. Az R_{min} a festék kalciumot nem kötött állapotához tartozó fluoreszcencia hányados, az R_{max} a kalciummal teljesen telített festék fluoreszcencia-hányadosának értéke. A β egy, a mérőrendszerre jellemző állandó. A mérőrendszerünk kalibrálása során a $K_d = 118$ nM-nak adódott, az R_{min} értéke 0,2045 volt a kísérletünk során, az R_{max} a 8,315, a β értéke 10 volt (Grynkiewicz és mtsai 1985, Szappanos és mtsai 2004).



16. ábra: A Photon Tehcnology International DeltaScan™ kettős monokromátor működése és a Fura2-AM kalcium-indikátorral történő mérés sematikus ábrája.

9. Elemi kalcium-felszabadulási események detektálása

Az elemi események detektálásának a céljából izolált vázizom-rostokat használtunk a különböző diétával kezelt Fischer patkányokból. Az izolált FDB izmokon az enzimátikus emésztést és a rostok pihentetését követően a sejtmembrán permeabilizálására került sor, melyet a mérőkádban végeztük.

Ismert, hogy emlős vázizmokon spontán elemi események igen ritkán detektálhatóak. A spark-frekvencia növelésére több eljárás is alkalmazható, amik az események mennyiségét és nem a minőségét változtatják. Mivel az elemi események létrejöttében alapvető szerepe van az SR és a T tubulus membrán közötti szerkezeti kapcsolatnak, és vázizom-tenyészetben az elemi események a T tubulustól mentes helyeken lokalizálódnak, ezért az egyik technika az emlős vázizomrostok mechanikai nyúzása. Ennek során a sejtfelszíni membrán és a T tubulus membrán mechanikusan eltávolításra kerül. A sejtfelszíni membrán eltávolítására jó

eredménnyel alkalmazható a saponin is, ami detergens hatásánál fogva a membránt permeabilizálja és ezzel egy időben nem sérti mechanikailag a membrán alatti struktúrákat (Szentesi és mtsai 2004).

Emellett az extracelluláris kalciumion-koncentráció növelésével vagy a magnéziumion-koncentráció csökkentésével szintén emelni lehet az elemi események gyakoriságát, továbbá a fő intracelluláris anion: a glutamát szulfátra való cseréjével, illetőleg ozmotikus sokk alkalmazásával is.

Munkánk során relaxáló oldatban (125 mM K-glutamát, 5 mM MgCl₂, 0,13 mM CaCl₂, 10 mM HEPES, 1 mM EGTA, 5 mM Na₂-ATP, 10 mM Na-foszfokreatin, 10 mM glükóz, 8% dextran, pH = 7,2) 0,01% saponint alkalmaztunk, 2-3 percig. Ily módon, amellett, hogy fokozni tudtuk az elemi események számát a rostokon, egyúttal a kalcium-indikátor festék bejutását is elősegítettük a rost belsejébe (Szentesi és mtsai 2004).

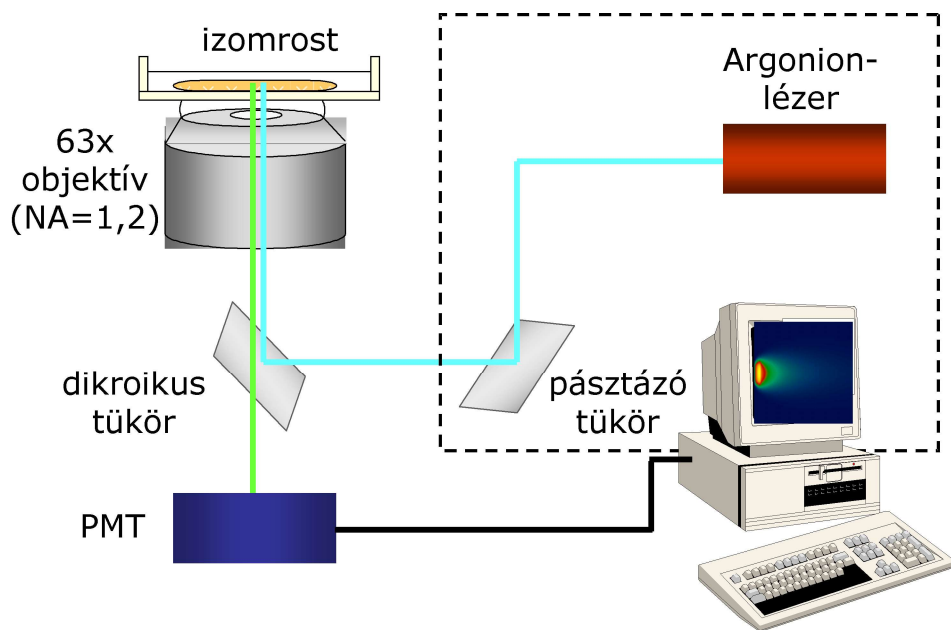
A spontán kalcium-felszabadulással járó események detektálására Fluo-3 fluoreszcens festéket használtunk a permeabilizáló oldatban, 50 µM koncentrációban. A fluo-3 alkalmas az élő sejtek belsejében történő mérésre, konfokális pásztázó mikroszkóppal történő detektálásra, lézermikroszkópos vizsgálatok végzésére. 488 nm hullámhosszúságú fényel gerjeszthető, emissziója 525 nm-nél van. A Fluo-3 festék kalciumot nem kötött állapotban mérhető, háttér fluoreszcencia értéke rendkívül alacsony, azonban kalcium-kötés hatására bekövetkező fluoreszcencia-intenzitás nagymértékű változása kellően érzékennyé teszi az olyan kismértékű intracelluláris kalcium-koncentráció változások detektálására, mint amilyenek az elemi kalcium-események: a sparkok.

A saponinnal permeabilizált és fluoreszcens festékekkel feltöltött rostokat üveg aljú mérőkádba, kálium-szulfát tartalmú relaxáló belső oldatba helyeztük, amiben a méréseinket végeztük. Az oldat összetétele az alábbiakból állt: 95 mM K₂SO₄, 1 mM EGTA, 6 mM MgCl₂, 0,26 mM CaCl₂, 5 mM Na₂-ATP, 10 mM glükóz, 10 mM Na-foszfokreatin, 10 mM HEPES, 8% dextran, 0,1 mM fluo-3, pH = 7,2. A szulfátió jelenléte hozzájárult az elemi események számának emeléséhez, de azok morfológiáját nem befolyásolta (Csernoch és mtsai 2003, Zhou és mtsai 2003).

A detektálást konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal (CLSM) végeztük (Zeiss LSM 510 META, Oberkochen, Németország) 22°C hőmérsékleten, 63x víz-immersiós objektívvel (NA 1,2). A Fluo-3-t argonion lézerrel gerjesztettük 488 nm-en, 5% lézerintenzitással.

A CLSM olyan optikai mikroszkóp, ami lehetővé teszi nem átlátszó, vastag biológiai minták különböző szöveti mélységeiben történő pontos vizsgálatát. A mikroszkópból érkező pásztázó lézersugár egy féligáteresztő tükrön áthaladva, fókuszálva jut el a mintához (17. ábra). A megfelelő hullámhosszú lézerfény gerjeszti a mintában használt fluoreszcens festéket, és a gerjesztett fény a tér minden irányába emittálódik. Az objektívbe csak a megfelelő irányba eső sugarak jutnak. Egy féligáteresztő tükrön keresztül a fénysugarak egy μm -es átmérőjű "pinhole" méretű apertúrán át érkeznek a detektorra. Ez biztosítja, hogy a fókusz síkon kívülről ne érkezhessenek fénysugarak a detektorra, vertikálisan limitálva a leképezést. Az emittált fényt egy sávszűrőn keresztül regisztráltuk.

A CLSM XY pásztázás funkciójának használatával horizontálisan tetszőleges méretben és választható sebességgel, soronként vizsgálhatjuk a mintát a kívánt vertikális szöveti mélységben (XY, vagy kétdimenziós leképezési mód). Ezt a technikát nem tudtuk alkalmazni az elemi események detektálása során, mivel a soronkénti térbeli leképezés időbeli paraméterei nem tették lehetővé a gyors jelenségek detektálását.

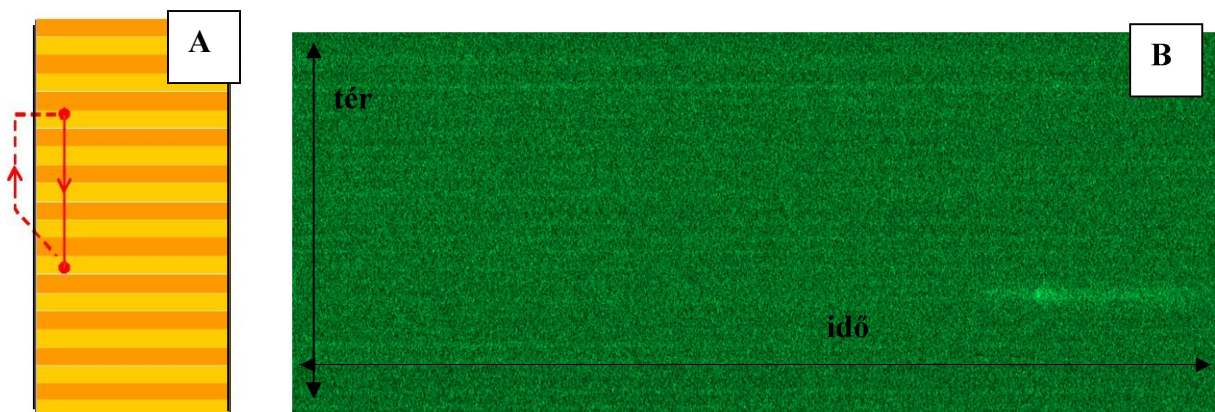


17. ábra: A konfokális lézermikroszkóp és az elemi események detektálásának sematikus ábrája. NA: numerikus apertúra, PMT: foton sokszorozó

Az általunk is használt *line scan* módban (18. ábra) a mintán (az izomroston) egy vonalat jelöltünk ki, amely mentén történt a pásztázás. Az így keletkezett képen a fluoreszcencia intenzitás változása látható oly módon, hogy az x tengelyen az idő függvényében ábrázolódik az y tengelyen a térbeli lokalizáció: az általunk kijelölt vonal origójától való távolság (18. ábra). A pásztázás sebessége ez esetben sokkal gyorsabb, mint az xy leképezésé, ezért az

elemi események detektálására ezt a leképzési módot használtuk. A pásztázandó vonalat a vázizomrost hosszával párhuzamosan jelöltük ki, 512 pixelből állt, egy pixel mérete $0,142\ \mu\text{m} \times 0,142\ \mu\text{m}$ volt. A pásztázás $2\ \mu\text{s}/\text{pixel}$ sebességgel történt, a vonal újrapásztázása $1,54\ \text{ms}$ után indult újra. A módszer segítségével 1024×512 pixel méretű képet kaptunk.

A detektálást követően 12 bites digitalizációt alkalmaztunk. Az elemi eseményeket tartalmazó képeket egy automatikus esemény-felismerő program segítségével elemeztük, melyet a munkacsoportunk fejlesztett (Szabó és mtsai 2010). A festék fakulására korrekciót alkalmaztunk. A fotokárosodás elkerülése végett egy pozícióban egyetlen mérést végeztünk és egy képet rögzítettünk. A fakulásra korrigált képeket a háttér fluoreszcenciára normalizáltuk. A szoftver a rögzített kép elemi eseményektől mentes részét használta a fakulás és a háttér fluoreszcencia meghatározásához. A fakulásra történő korrekció során a mért fluoreszcencia intenzitását az y tengely mentén átlagoltuk és simítottuk. A háttér fluoreszcencia meghatározása az x tengely mentén történő átlagolással történt, simítás nélkül.

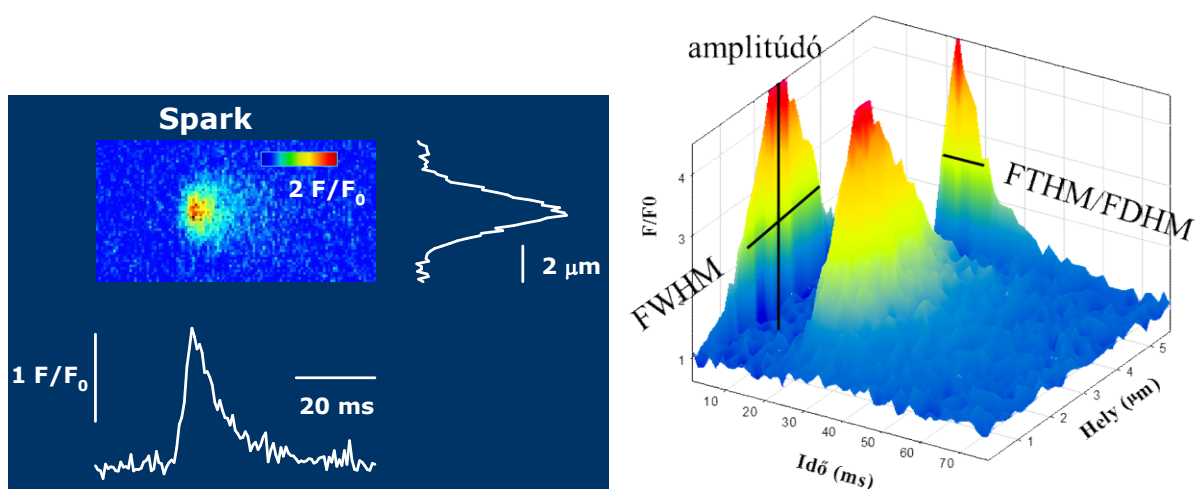


18. ábra: A vonal menti leképezés sematikus ábrája. *A: egy izomrost sematikus rajza, rajta a hossz tengelyével párhuzamosan felvett vonal pirossal. A szaggatott vonal jelöli, hogy időben többször ismételve történik a vonal pásztázása. B: egy line scan módban készült kép, amin az X tengely idő dimenziót, az Y tengely tér dimenziót (a felvett vonal mentén) ábrázol. (Munkacsoportunk saját anyaga)*

A program a *wavelet transformation* elv alapján detektálta az elemi eseményeket és ezt követően meghatározta azok, általunk igényelt paramétereit. A sparkok jellemzésére az alábbi, a 19. ábrán bemutatott paramétereket használtuk és számoltattuk ki a programmal:

- az amplitúdó: normalizált fluoreszcencia növekedés ($\Delta F/F_0$), vagyis ebből számított kalcium-koncentráció változás;

- a teljes időbeli hossz (*duration*);
- a TTP vagy *rise time* az amplitúdó (csúcs) eléréséhez szükséges idő; értékéből az SR-ből történő kalcium-felszabadulás időtartamára következtethetünk;
- az FTHM, ami a maximális jelintenzitás, vagyis az amplitúdó 50%-os értékénél mért időtartam;
- az FWHM, ami a térbeli szélesség jellemzésére szolgál: az FTHM-hez tartozó térbeli szélesség, vagyis az amplitúdó 50%-nál mért térbeli kiterjedés.



19. ábra: A kalcium-spark morfológiája. Az $y-t$ leképzésnek megfelelően térbeli és időbeli jellemzők, és a jel-intenzitást reprezentáló amplitúdó. FTHM: full time at half maximum, FWHM: full width at half maximum.

10. Statisztikai analízis

Az azonos kezelési csoportból származó adatokat átlagoltuk, és az átlagok standard hibáit számítottuk ki. A szövegben és az ábrákon az eredményeket mindenütt átlag \pm standard hiba (SEM, standard error of the mean, az átlagtól való eltérés standard hibája) formában adtuk meg. A szignifikanciát egy utas (one way) ANOVA variancia-analízis és a megfelelő post hoc próba, a Student-Newman-Keuls Módszer segítségével határoztuk meg. Mivel a sejt-tenyészet eredményei nem mutattak normál eloszlást, Mann-Whitney-féle rangösszeg próbát használtunk. 95%-os konfidencia intervallumot használtunk, tehát a különbségeket $P < 0,05$ esetén tekintettük szignifikánsnak.

Az elemi események, sparkok esetében n a sparkok számát jelöli, egyébként n a rostok vagy izmok számát adja meg az adott kezelési csoporton belül.

A hypercholesterinaemiát okozó diéták esetében a statisztikai számítások során a TU kezelési csoportot használtuk referencia csoportként.

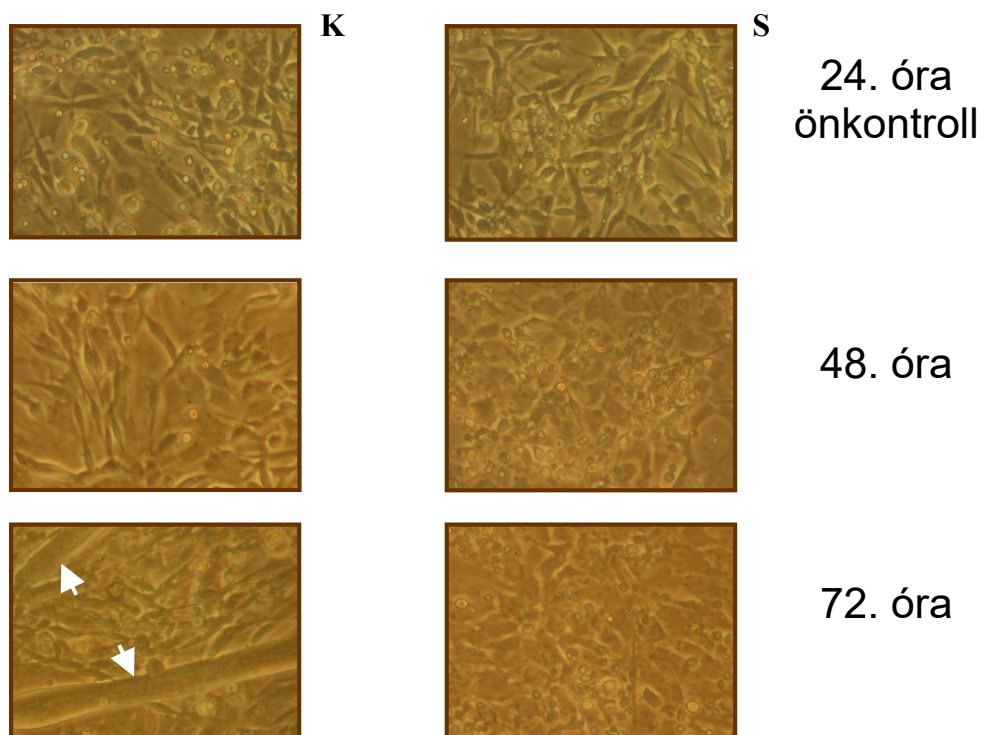
IV. Eredmények

1. A statin-kezelés hatása a primer vázizom sejt kultúrára

Általános, morfológiai megfigyelések

A proliferáló médiumban a vázizomsejtek majdnem teljes konfluenciát értek el 24 óra alatt (20. ábra). Kontroll körülmények között, a differenciáló médiumban további 24 óra alatt orsóformát vettek fel a sejtek. A sejtek száma láthatóan csökkent. (A pontos számadatokat a későbbiekben részletezzük.) Ennek magyarázata, hogy elkezdődött a rostok kialakulása, melynek kezdeti lépéseként a sejtek egymásba olvadtak és több magvú sejtek jöttek létre a vázizom-sejt fúzió következtében. További 24 óra elteltével a sejtek a tárgylemezen elérték a teljes konfluenciát, több rétegben egymásra nőttek és emellett látóterenként észlelhető voltak, nagy myotubulusok, amelyek több, mint tíz sejtmagot tartalmaztak és ezek számos esetben sokszor tíz magból álltak.

Azok a tenyészetek, ahol a differenciáló médium *fluvastatin*nal lett kiegészítve, 24 óra differenciálást követően az orsó formáció mennyisége szemmel is látható módon elmaradt a kontroll tenyészetekhez képest, és további 24 óra múlva sem volt észlelhető jelentős változás: alig volt orsó alakú izomsejt és sok kerek, nem differenciált sejtet lehetett látni. A vázizom-sejt fúzió alig volt észlelhető, és nagy myotubulusok szinte egyáltalán nem alakultak ki a tenyésztés során, illetőleg az a néhány több magvú sejt is szemmel láthatóan is sokkal rövidebb és vékonyabb volt, mint a kontroll myotubulusok, ami arra utal, hogy kevesebb sejt fúziójának eredménye. A statin jelenlétében fejlődő tenyészetekben az izomrostok alig több, mint tíz magból álltak, míg a kontroll myotubulusok nem csak sokkal gyakoribbak, de sokkal nagyobbak is voltak (20. ábra).



20. ábra: K, S tenyészetek reprezentatív képei a tenyésztési idő függvényében. A 24 órás fénykép a proliferáltató fázis után készült, eddig az összes csoport kontroll médiumban nőtt. 24 óra után, a differenciáció fázisában fluvastatinnal egészítettük ki a tápoldatokat. A nyilak a nagy, több, mint tíz magot tartalmazó myotubulusokat jelölik.

A részletes, mennyiségi elemzés eredményei

A részletes morfolometriai analízis során nem a sejtszámot, hanem a *myogen sejtmagok számát* használtuk fel mennyiségi analízis céljából, mivel a differenciálódás során a sejtszám csökken az érettebb forma, a myotubulus megjelenésekor az izomsejtek fúziója miatt.

A kontroll csoportban a myogen magok száma emelkedett a tenyésztés során. Kiindulási értéknek a 24 órás proliferációs fázis utáni állapotot tekintettük minden csoportban, ehhez viszonyítottuk az adott tenyészet 48 és 72 óránál detektált értékeit (önkontrollos elrendezés), így kaptuk a relatív magszámokat. A kontroll csoportban a referencia-érték (24 óra proliferáció utáni magszám) meghatározását követően az első 24 óra alatt 58%-os relatív myogen magszám-emelkedést észleltünk, míg a második 24 óra alatt további 54%-os növekedést tapasztaltunk az előző napi eredményekhez képest. Ezzel ellentétben, a S csoportban az első 24 óra alatt csak 3%-al növekedett a myogen magok száma, és a következő 24 órában 18%-os (nem szignifikáns mértékű) csökkenés volt megfigyelhető az izom eredetű magok számában (21.A ábra). A kontroll értékekhez viszonyítva a statin-kezelt csoport adatai

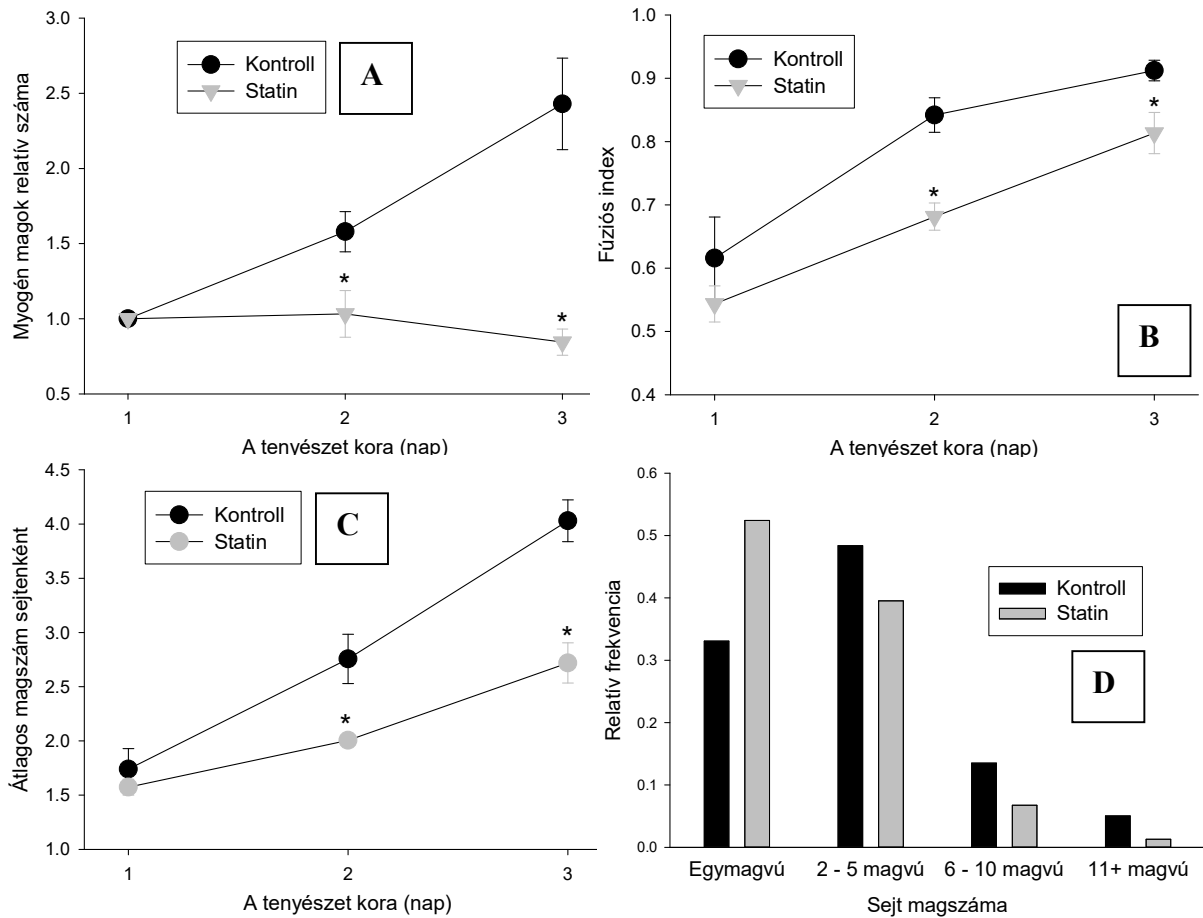
szignifikánsan különböztek (alacsonyabbak voltak) mind a második, mind a harmadik tenyésztési napon.

A *fúziós indexet* az izomsejtek differenciáltságának megítélésére használtuk. A fúziós index a több magvú sejtekben lévő myogen magok aránya az összes myogen maghoz viszonyítva. A fúziós index mind a kontroll, mind a statin-kezelt csoportban konstans módon emelkedett, azonban a S kezelési csoportban értéke szignifikánsan alacsonyabb volt mindkét napon (21.B ábra).

Értékeljük a tenyészet fejlettségét oly módon is, hogy megállapítottuk az *izomsejtek átlagos magszámát*. 48 óra tenyésztést követően a kontroll csoportban átlagosan az izomsejtek 2 magvúak voltak, és 72 óra tenyésztési időnél 3 magvúak. A fluvastatin jelenléte az izomsejtek átlagos magszámát szignifikánsan csökkentette: 48 óra tenyésztési időnél még átlagosan mononukleárisak voltak az izomsejtek és 72 óra tenyésztésnél is csak két magvúak (21.C ábra).

Részleteiben megvizsgálva *az izomsejtek méretét* azt kaptuk, hogy a 72 óra tenyésztési idő elteltével kontroll körülmények között a legtöbb sejt 2-5 magvú volt, az ettől nagyobb, több maggal rendelkező sejtek/rostok 20%-ban fordultak elő átlagosan: a sejtek átlag 15%-a 6-10 magvú volt, és 5%-a több, mint 10 maggal rendelkező myotubulus volt. Azonban a fluvastatinnal kezelt csoportban 72 óra tenyésztést követően is az izomsejteknek még több, mint 50%-a mononuclearis volt. A myogen sejtek további 40%-a 2-5 maggal rendelkezett, és az ettől is nagyobb, differenciáltabb izomsejtek/tubulusok csak összesen 6%-ban voltak jelen a tenyésztési idő végén (a kontroll csoportnál a 6 vagy több magvú sejtek aránya 20%-t tett ki), (21.D ábra).

Összességében a statin kezelés hatására szignifikánsan kevesebb vázizomsejtet kaptunk. A sejtproliferáció gátlása mellett a fluvastatin alkalmazásával az izomsejtek differenciálódása is elmaradt a kontroll tenyészetben tapasztaltakhoz képest.



21. ábra. A fluvastatin hatása a vázizomsejtek proliferációjára és differenciálódására. Primer vázizom sejt kultúra. A: A miogén magok relatív számát a 24 h tenyésztési időnél mért értékekhez viszonyítottuk, mivel ekkor kezdtük a kezelést a statin csoportban. **B:** A fúziós index a több magvú sejten számolt miogén magok számát adja meg az összes miogén magszámhoz viszonyítva. **C:** Az egy izomsejtben található magok átlagos számának változása a tenyésztés során. **D:** A hisztogram az izomsejtek fejlettségbeli megoszlását ábrázolja a sejtek átlagos magszámának megoszlása alapján. Tenyésztési idő: 72 óra. *: szignifikáns különbség a kontrollhoz képest ($p < 0,05$).

2. Anatómiai eredmények

Az állatok átlagos súlyában kismértékű különbséget találtunk az egyes kezelési csoportok között a különböző diéták hatására (4. táblázat). A relatív izomtömeg (a testtömeghez viszonyított izomtömeg) a TU, HC és HC+S kezelési csoportokban kisebb volt a kontroll állatokhoz képest, mind az EDL, mind a Sol és a szívizom esetében is. A HC és HC+S diéták esetében a kontrollként használt TU csoporthoz hasonlítva a vázizmok testtömeghez viszonyított arányában nem volt jelentős különbség. Statin kezelés hatására a kontroll

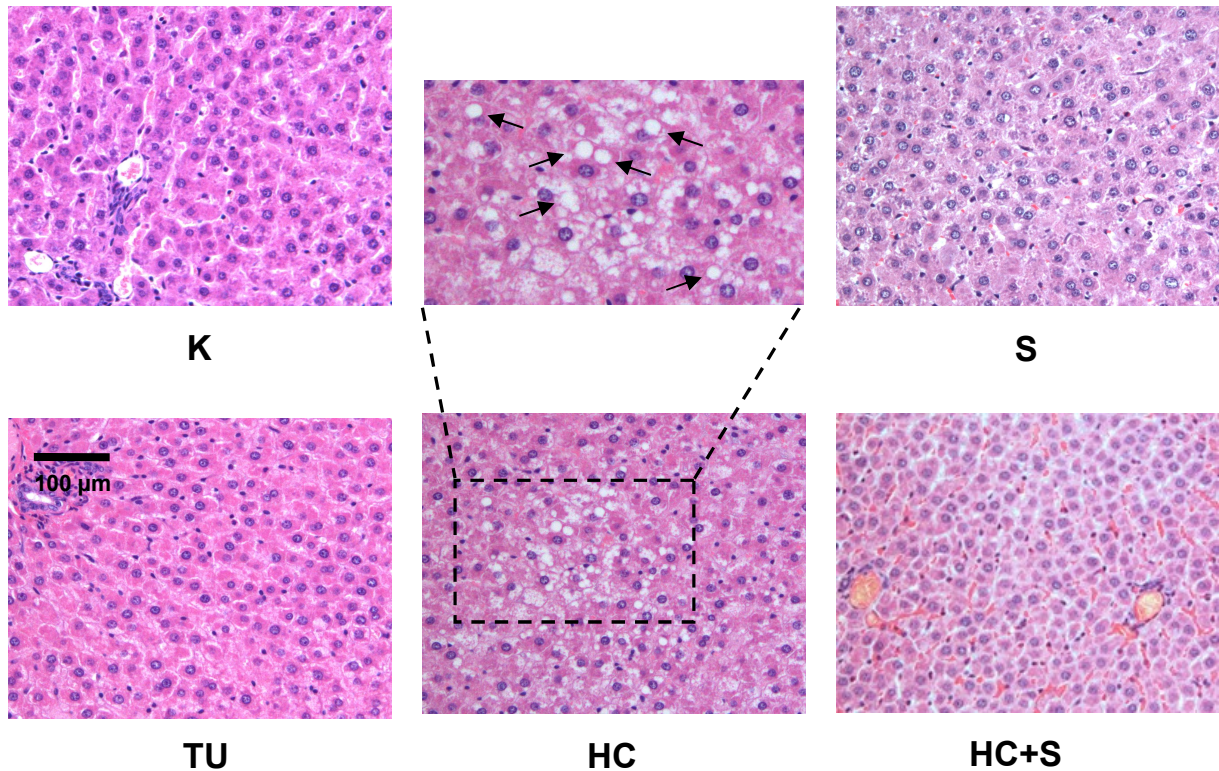
állatokhoz képest szintén csökkent mind az EDL, mind a Sol izmok testtömeghez viszonyított aránya, a Sol izmok esetén kifejezetten. A szívizom testtömeghez viszonyított tömege szintén alacsonyabb volt a statin terápiában részesülő állatok esetén a kontrollhoz képest (4. táblázat).

	össztömeg (W)	szív	m. EDL	m. Sol	EDL/W	Sol/W	Szív/W
	(g)	(mg)	(mg)	(mg)	%	%	%
K (n=6)	127,3±20,5	527±34	76,4±3,3	91,0±6,6	60±7	71±5	4,1±0,8
S (n=5)	124,7±0,9	450±18	63,8±1,0	71,7±2,9	51±4	57±2	3,6±0,5
TU (n=6)	134,1±9,8	354±10	56,5±3,3	72,3±3,3	42±5	54±3	2,6±0,2
HC (n=4)	119,3±2,1	356±27	51,1±3,1	67,7±2,8	43±3	57±4	3,0±0,4
HC+S (n=5)	132,3±3,6	358±36	55,1±3,6	73,8±6,9	42±4	56±2	2,7±0,3

4. táblázat: anatómiai eredmények. *A különböző kezelési csoportokban mért átlagos testtömeg, a szívizom, a m. EDL és Sol tömege, és a szerv-tömegek testtömeghez viszonyított %-os aránya. Zárójelben az állatok száma található.*

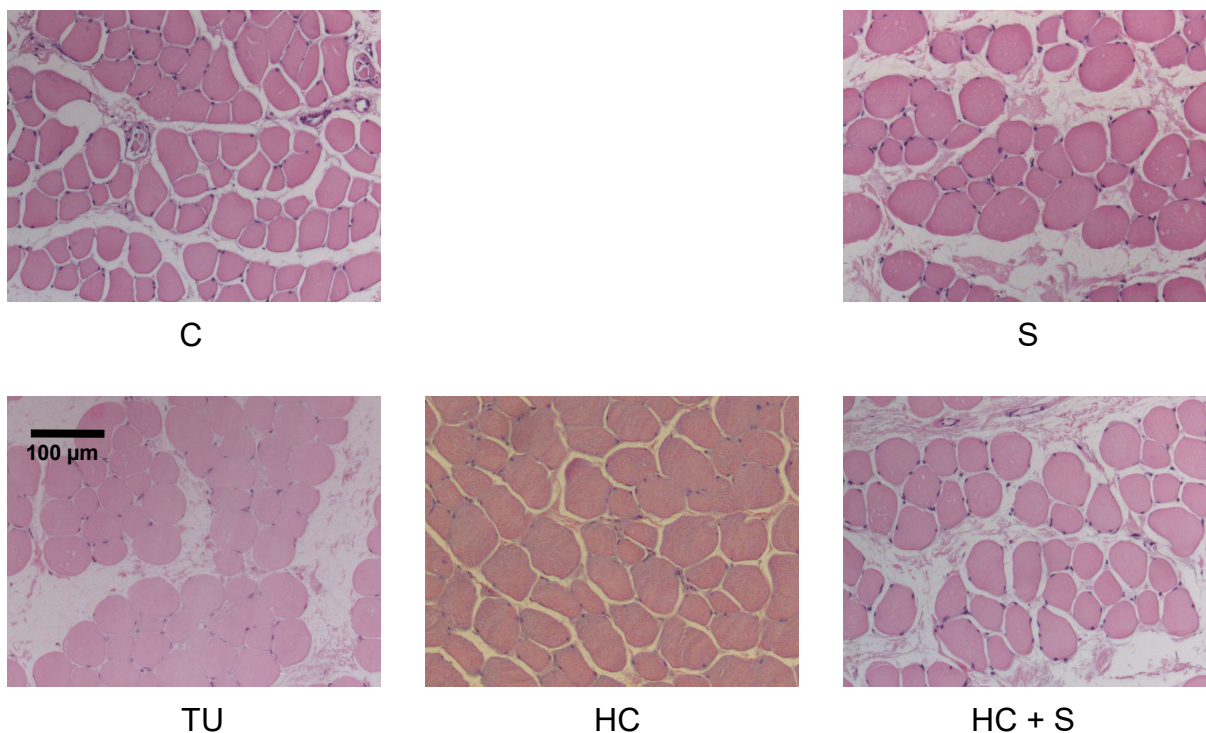
A patológiai feldolgozás során makroszkópos szervi eltérést nem észleltünk, a vizsgált szervek morfológiája megtartott volt.

Mikroszkópos vizsgálattal a májban észleltünk szövettani eltérést: a koleszterin-dús étrend (HC) hatására a májban mérsékelt fokú zsíros degenerációt találtunk. A májsejtek között kerek, kis és nagyméretű lipid-cseppecskék felhalmozódása volt látható a szövettani metszeten (22. ábra). A vese és a szív szerkezetében fénymikroszkóppal detektálható patológiás eltérést egyik kezelési csoportban sem észleltünk.



22. ábra. A máj fénymikroszkópos képe a különböző kezelési csoportokban. Fénymikroszkóppal a máj szerkezetében szöveti eltérés nem volt látható a K, S, TU kezelési csoportokban. Mérsékelt zsíros degeneráció (kis és nagy lipid cseppek, nyíllal jelölve) volt látható a HC, HC+S csoportokban. HE festés, 300x nagyítás.

A vázizmok fénymikroszkópos vizsgálata során egyértelmű vázizom-károsodás jeleit nem tudtuk kimutatni. A harántcsíkolat megtartott volt. Kifejezett gyulladási jeleket sem észleltünk egyik kezelési csoportban sem. Az egyedi izomrostok keresztmetszetének elemzése során azt tapasztaltuk, hogy a statin-kezelésben részesülő állatok izomrost- keresztmetszet értékei nagy szórást mutattak, a rostok átmérőjének viszonylagos homogenitása megbomlott és relatíve vastag és vékony rostok egyaránt előfordultak. A többi kezelési csoportra ez nem volt jellemző, ott az egy izomban lévő rostok keresztmetszetének értékei nem mutattak nagy differenciát. (23. ábra). A statin-kezelt csoportokban (mind a S, mind a HC+S csoportban egyaránt) az átlagos izomrost- keresztmetszet is szignifikánsan csökkent, mivel a relatíve vékonyabb rostok fordultak elő nagyobb számban. K (n=161): $1835 \pm 79 \mu\text{m}^2$, S (n=288): $1448 \pm 44 \mu\text{m}^2$; HC (n=116): $2065 \pm 82 \mu\text{m}^2$, HC+S (n=226): $1664 \pm 44 \mu\text{m}^2$. A kontroll állatokhoz képest sem a HC, sem a TU csoportban mért keresztmetszetek nem különböztek szignifikánsan. (TU (n=128) $1801 \pm 65 \mu\text{m}^2$.)



23. ábra. Az EDL izom fénymikroszkópos képei a különböző kezelési csoportokban.

Egyik kezelt csoportban sem látható strukturális eltérés a fénymikroszkópos vizsgálat során. A statinnal kezelt csoportokban a rostátmérők méretbeli ingadozása figyelhető meg. HE festés, 300x nagyítás.

3. A szérum lipidek és a kreatin-kináz enzim meghatározásának eredményei

A kontroll patkányok szérumból mért koleszterin, triglicerid és CK értékeit a referencia-tartományon belül mértük, és a HDL/LDL arány is megfelelt a rágsálóknál megszokott erős HDL dominanciának. (Suckow 2006, Yerroum és mtsai 1999)

A diéta hatására a HC patkányok koleszterin értékei több, mint hétszeres emelkedést mutattak (5. táblázat). Emellett a két lipoprotein aránya is megfordult: a HC állatok vérmintáiban az atherogen LDL dominált (az emberi szérum koleszterin-arányokhoz hasonlóan), míg a protektív HDL csak az össz-koleszterin kb. 40%-a volt (5. táblázat).

A statin kezelés a lipoproteinek arányát nem befolyásolta. Az irodalmi adatok alapján a HMG-CoA-reduktáz kezelés patkányoknál alapvetően a triglicerid koncentrációt csökkenti. A

mi eredményeink is ezt támasztják alá (5. táblázat), bár valószínűleg az alacsony mintaszám miatt statisztikailag nem szignifikáns a csökkenés mértéke. (Krause és mtsa 1995)

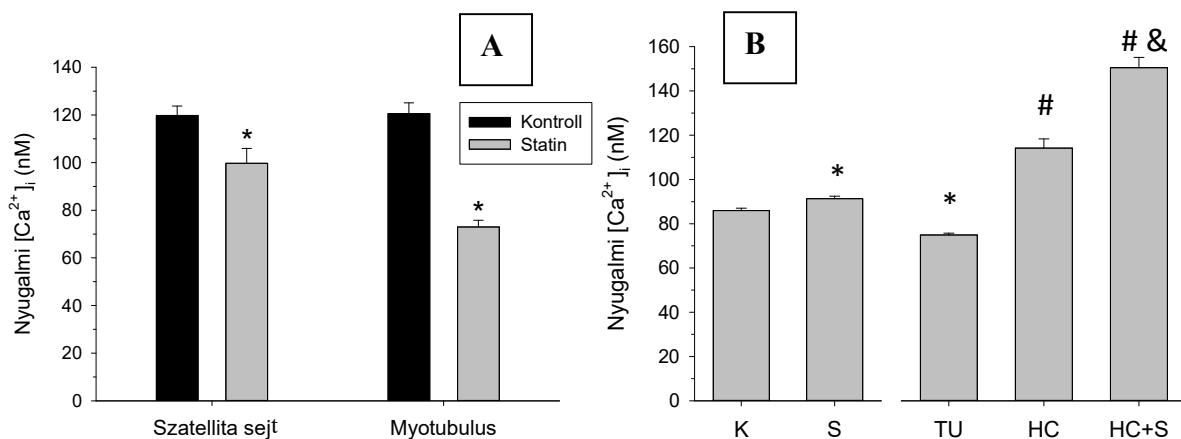
A statin diéta mellett a szérum CK értékei szignifikánsan és jelentős mértékben emelkedtek: a S állatok CK értéke kb. 1,5-szerese volt a kontrollnak. (5. táblázat). A HC diéta mellett alkalmazott statin jóval nagyobb arányban, kb. háromszorosára növelte a CK értékét (5. táblázat), ami már vázizom-károsodásra, miopátia jelenlétére utal. Ez az eredmény a Statin Muscle Safety Task Force 2014 klasszifikációja alapján az enyhe izomnekrózis kategóriába sorolható, így bizonyítottan tekinthetjük az izomkárosodás jelenlétét. Az európai besorolást nem tudtuk alkalmazni, mivel itt a szubjektív tünetek (SAMS) megléte a klasszifikáció alapja, amit kísérleti körülményeink között nem tudunk mérni. Sem a TU, sem a HC diéta nem emelte a CK értéket. Véleményünk szerint a CK alapvetően a vázizmokból származik, mivel szívizom-károsodásra (pl. miokardiális infarktus) utaló makroszkópos vagy mikroszkópos eltérést nem tapasztaltunk. Ha az átlagos izomtömegre, pl. az EDL átlagos tömegére normalizáljuk a különböző diétás csoportokban mért CK értékeket, a statin kezelés hatása még markánsabban jelentkezik, mivel az emelkedett CK értékeket alacsonyabb izomtömegek mellett detektáltuk.

	Minta szám	Koleszterin (mmol/l)	TG (mmol/l)	CK (U/l)	HDL/LDL (mmol/l/mmol/l)
TU	9	1,45±0,08	0,35±0,04#	563,9±136	3,44±0,6#
S	10	1,58±0,10	0,56±0,06	959,6±361	6,57±0,9
HC+S	12	6,81±1,69*	0,46±0,06	1513,4±410*\$	0,94±0,2*
HC	16	10,74±2,0*	0,53±0,06*	576,3±149	0,64±0,1*
K	15	1,52±0,05	0,74±0,08	636,3±139	9,95±1,8

5. táblázat: Vércserumban mért lipid- és CK értékek. Az szérum össz-koleszterin, triglicerid, CK koncentráció és HDL/LDL arány a különböző kezelési csoportokban. A HC és HC+S kezelések esetében kontrollként a TU csoportot használtuk. $p < 0,05$: * vs. TU, # vs. K, \$ vs. HC

4. Az intracelluláris nyugalmi kalcium-koncentráció meghatározásának eredményei

A *tenyésztett vázizom sejtek* nyugalmi intracelluláris kalcium-ion koncentrációját ($[Ca^{2+}]_i$ -t) meghatároztuk mind a differenciálódás előtt álló szatellita sejtek, mind a myoblast-fúzió után átesett myotubulusok esetében. A kontroll tenyészeteken a fejlődő vázizom-sejtek nyugalmi $[Ca^{2+}]_i$ -ja között gyakorlatilag nem volt különbség (24.A ábra). A S csoportban a nyugalmi $[Ca^{2+}]_i$ szignifikánsan kisebb volt, mint a kontroll csoportban, és a myotubulusok értékei további csökkenést mutattak a szatellita sejtek értékeihez képest is (24.A ábra). A különbség itt is szignifikáns volt a kontroll értékéhez viszonyítva.

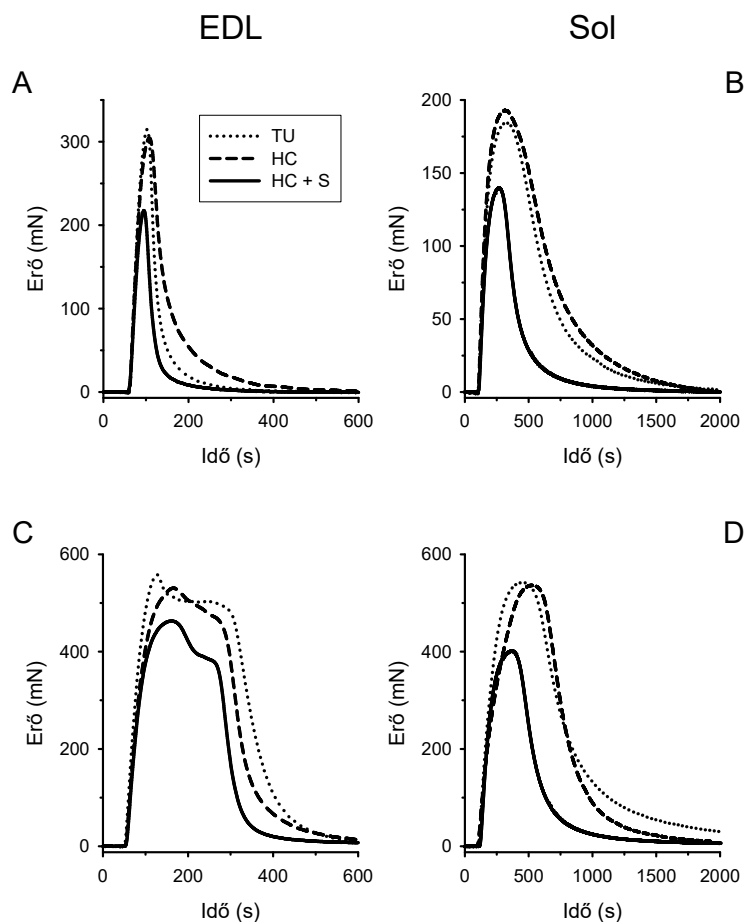


24. ábra. Nyugalmi kalcium-koncentráció *A: Patkány primer vázizomtenyészetből származó szatellitasejtek és myotubulusok. B: Izolált patkány vázizomrostok. *: $p < 0,05$ vs. K; #: $p < 0,05$ vs. TU; &: $p < 0,05$ vs. HC.*

Ezzel ellentétben a *felőtt állatokból izolált, fluvastatinnal tartósan kezelt izomrostok* nyugalmi $[Ca^{2+}]_i$ -ja ellentétes irányba változott: szignifikánsan emelkedett a kontroll állatokéhoz képest. Ez az emelkedés a koleszterin-kezeléstől függetlenül jelentkezett, a hyperkoleszterinaemiás diéta mellett is tapasztaltuk, még kifejezettebb mértékben. A HC diéta önmagában is szignifikánsan megemelte az izolált rostok nyugalmi intracelluláris kalcium-koncentrációját. A HC diéta mellett alkalmazott fluvastatin kezelés szignifikánsan magasabb nyugalmi $[Ca^{2+}]_i$ -t eredményezett mind a TU, mind a HC diétás csoporthoz képest. A tiouracyl kezelés önmagában kis mértékben csökkentette a nyugalmi kalcium koncentrációt. A különbség szignifikáns volt a kontroll értékhez viszonyítva. Itt is kiemelném, hogy a HC és a HC+S diéták esetében a TU kezelési csoportot használtuk viszonyítási alapnak (24.B ábra).

5. Az izomerő vizsgálatának eredményei

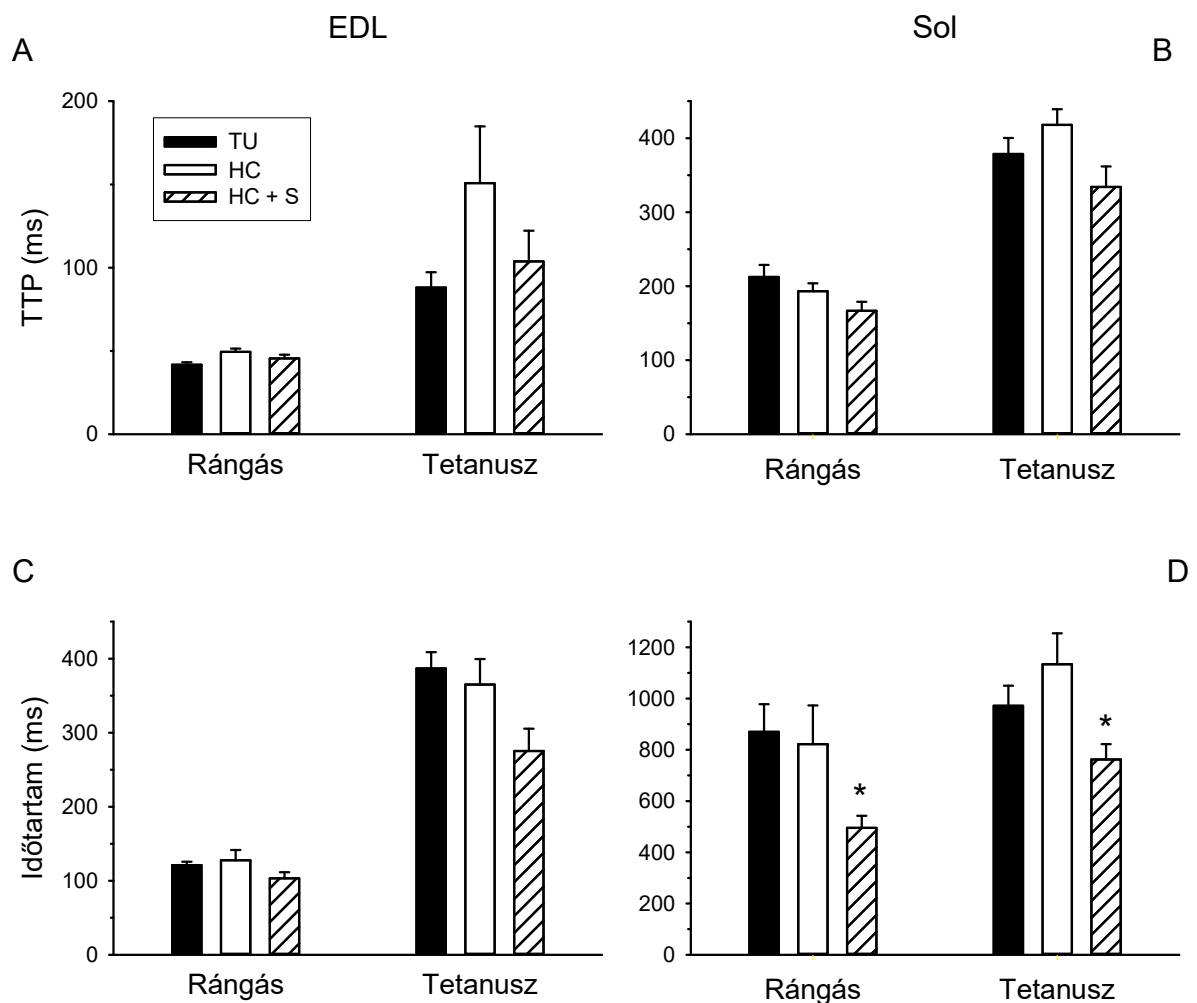
A különböző diétás csoportokból származó különböző típusú izmok (a gyors típusú EDL, és a lassú Sol izmok) kontrakciós erejét egyaránt meghatároztuk. Kezdeti lépésként összehasonlítottuk az egyedi rángások (a twitch-ek) és a tetanusok kinetikáját a TU (mint kontroll csoport), a HC és a HC+S kezelési csoportokban (25. ábra). A kontrakciók időbeli lefolyása hasonló volt a TU és a HC diéta mellett. Azonban szembeötlő volt a különbség, hogy a statinkezelésben is részesülő HC+S csoportban mind a twitch, mind a tetanusz amplitúdója kisebb volt mind a HC, mind a TU csoporthoz képest. Illetőleg a kontrakciók hossza is rövidebbnek adódott ebben a kezelési csoportban. A pontos számadatokat alább részletezem.



25. ábra. TU, HC és HC+S állatokból izolált izmokon mért erő tranziensek *A felső paneleken twitch (A: EDL; B: Sol) időbeli lefutása látható. Az alsó paneleken a komplett tetanusz (C: EDL; D: Sol) kinetikáját ábrázoltuk.*

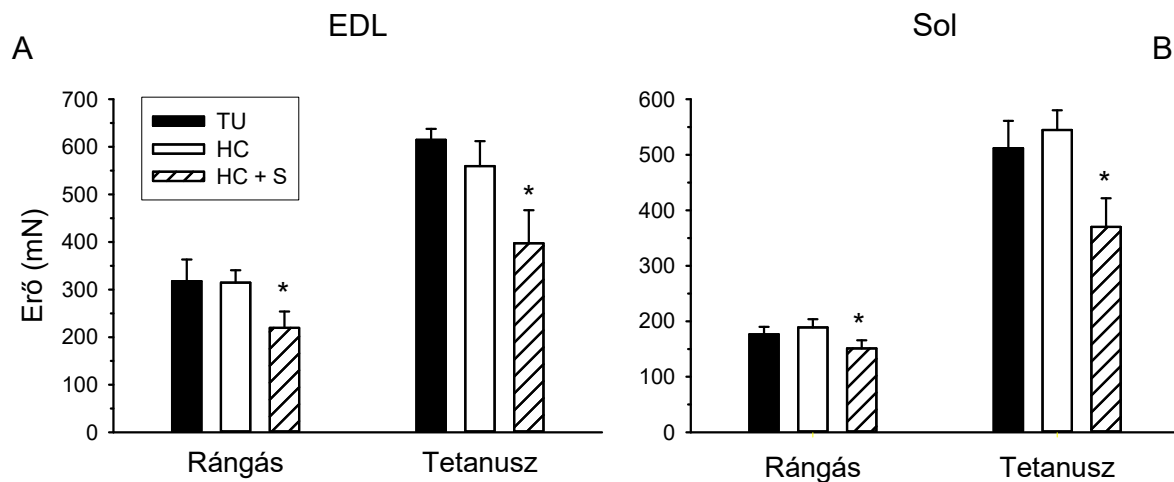
Tartós statinkezelés hatására megváltozott az izomkontrakciók időbeli kinetikája. Részleteiben vizsgálva meghatároztuk a TTP és az időtartam átlagos értékeit a különböző diétás csoportokban mind twitch, mind tetanusz esetében; mind az EDL, mind a Sol izmokon (26. ábra).

A TTP érték sem az EDL, sem a Sol esetében nem mutatott szignifikáns különbséget a statinkezelés hatására. Azonban a Sol izmokon regisztrált kontrakciók teljes időtartama átlagosan mind a twitch, mind a tetanusz esetében szignifikánsan rövidebb volt a statinkezelt (26. ábra) állatokban, és ez a tendencia az EDL esetében is megfigyelhető volt, bár a különbség mértéke nem adódott szignifikánsnak.



26. ábra. Az izom-összehúzódsok kinetikai paramétereit A,B: Az amplitúdó-maximum elérésének ideje (TTP) EDL (A) és Sol (B) izmok esetén. C,D: Az izom-összehúzóds teljes időtartama EDL (C) és Sol (D) izmok esetén. *: $p < 0,05$ vs. TU.

Az összehúzódnások amplitúdóját is összehasonlítottuk a különböző kezelési csoportokban, mind az EDL, mind a Sol izmok esetében. A 27. ábrán az összesített eredmények láthatóak. A HC+S csoportban mind a twitch, mind a tetanusz során elért maximális izomerő szignifikánsan kisebb a HC csoporthoz képest mind a két izomtípus esetében. A HC és TU állatok között nem tudtunk szignifikáns különbséget kimutatni az abszolút izomerőben.



27. ábra: Maximális izomerő TU ($n=5$), HC ($n=6$) és HC+S ($n=10$) állatok mintáiból számított átlagolt, abszolút izomerő. A: EDL, B: Sol izmok eredményei. * $p < 0,05$ vs. HC

Fontos azonban kiemelni, hogy a statinkezelt és hypercholesterinaemás csoportban az állatok izomrostjainak keresztmetszeti területe szignifikánsan kisebb volt, mint a HC állatoké. Ezért az izomerőt a keresztmetszetre normalizálva is összehasonlítottuk az összesített eredményeket a HC és a HC+S csoportokban (6. táblázat). Az EDL izmok mérési eredményei: a HC csoportban $17,6 \pm 3,1$ mN/mm² volt a twitch-ek átlagos, keresztmetszetre számolt izomereje vs. a HC+S kezelés mellett $17,2 \pm 3,3$ mN/mm². A tetanusz mérésekor a HC diéta mellett $31,5 \pm 5,8$ mN/mm²-nek adódott az átlagos, keresztmetszetre számolt izomerő vs. a HC+S csoportban $34,5 \pm 7,8$ mN/mm²-t kaptunk. A Sol esetében a HC kezelési csoportban a twitch keresztmetszetre vonatkoztatott átlagos erejét $7,7 \pm 0,7$ mN/mm²-nek mértük vs. a HC+S diéta mellett $7,0 \pm 0,7$ mN/mm²-t kaptunk a twitch esetében. A tetanusz mérésekor a HC diétás csoportban $22,5 \pm 2,4$ mN/mm² volt az átlagos, keresztmetszetre vonatkoztatott izomerő vs. a HC+S kezelés mellett $20,2 \pm 4,5$ mN/mm².

Összességében sem a gyors, EDL izmok, sem a lassú, Sol izmok esetében nem volt szignifikáns különbség az ily módon mért izomerőkben (sem a twitch-ekében, sem a tetanuszokéban) a két kezelési csoport között. (6. táblázat)

		HC (mN/mm ²)	HC+S (mN/mm ²)
EDL	twitch	17,6±3,1	17,2±3,3
	tetanus	31,5±5,8	34,5±7,8
Sol	twitch	7,7±0,7	7,0±0,7
	tetanus	22,5±2,4	20,2±4,5

6. táblázat: Keresztmetszetre normalizált izomerő A HC és HC+S csoportokban a keresztmetszetre normalizált izomerő, twitch és tetanusz ingerlés mellett, EDL és Sol izmok esetében.

Ezek alapján úgy véljük, hogy inkább az izomszövet-vesztés állhat az abszolút izomerő csökkenésének hátterében, és nem az egyes rostok maximális erejének csökkenése miatt látunk kisebb kontrakciós erőt a statinkezelésben részesült csoportban.

Az izmok fáradását tetanusz-sorozatok kiváltásával vizsgáltuk. Maximális izomerő mellett a tesztsorozat végén mért tetanusz amplitúdóját hasonlítottuk össze a sorozatban kiváltott első tetanusz amplitúdójával. Az EDL izmok vizsgálatakor nem tapasztaltunk szignifikáns mértékű különbséget az izomerő-csökkenés mértékében. A TU kezelési csoportban a kezdő maximális erő $63 \pm 3\%$ -ra csökkent az izomerő a fáradás során, $n=5$ vs. a HC csoportban $72 \pm 3\%$ -ra csökkent a sorozat végén mért amplitúdó, $n=6$ (7. táblázat). A HC+S diéta mellett $76 \pm 5\%$ -ra csökkent a maximális izomerő a sorozat utolsó tetanuszában, $n=8$. Azonban a Sol izmok esetében a HC+S csoport izmai szignifikánsan nagyobb mértékű fáradást mutattak mind a TU-hoz, mind a HC csoporthoz viszonyítva. A TU kezelés mellett a fáradás mértéke $79 \pm 5\%$ volt, $n=7$, a HC csoportban ettől nem tért el jelentősen: $80 \pm 3\%$ -nak adódott, $n=6$; míg a HC+S kezelés mellett szignifikánsan kisebb volt a sorozat utolsó tetanuszában mért izomerő, tehát nagyobb a fáradás mértéke: a kiindulási érték $64 \pm 6\%$ -a, $n=9$ (7. táblázat).

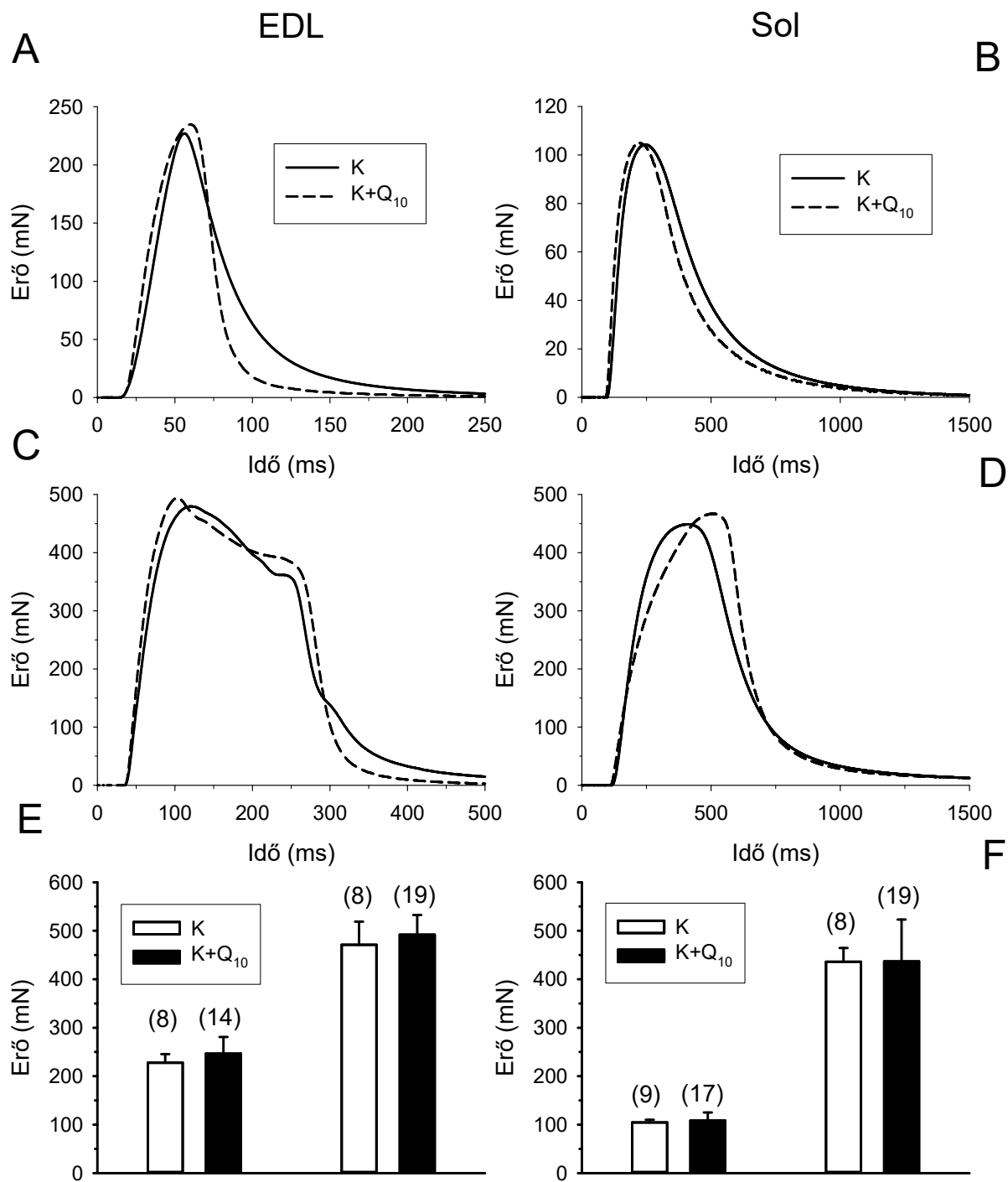
	TU	HC	HC+S
EDL	63±3% n=5	72±3% n=6	76±5% n=8
Sol	79±5% n=7	80±3% n=6	64±6% ^{*,#} n=9

7. táblázat: Tetanusz-sorozattal kiváltott fáradás mértéke A TU, HC és HC+S kezelési csoportokban tetanusz-sorozattal kiváltott fáradás mértéke EDL és Sol izmok esetén. A fáradás a maximális izomerő elérését követő első és az adott ingerlési sorozatban az utolsó tetanusz amplitúdójának hányadosával jellemezhető, százalékban megadva. * $p < 0,05$ vs. TU, # $p < 0,05$ vs. HC

Összességében megállapítottuk, hogy a hypercholesterinaemia nem változtatta meg az általunk vizsgált vázizmok működését, sem a kontrakció kinetikájában, sem a kontrakció erejében nem találtunk különbséget a kontroll-csoportunkhoz (TU) képest. Azonban a statinkezelés csökkentette az általunk vizsgált izmokon a kontrakciók időbeli hosszát: mind az egyedi összehúzódásokét, mind a tetanuszokét, és a csökkenés mértéke a lassú típusú Sol izmok estében szignifikáns mértékű volt. Emellett a fluvastatin adagolás szignifikánsan csökkentette a vázizom-kontrakció erejét. A statin-indukálta izomerő csökkenés mellett emelkedett intracelluláris nyugalmi kalcium-koncentrációt találtunk.

Ezt követően megvizsgáltuk, hogy a Q10 koenzim kiegészítő adagolása hatással van-e az általunk észlelt, fluvastatin által generált vázizom-funkció csökkenésre, vagy annak mértékére. Ezért első lépésben megvizsgáltuk, hogy a koenzim Q10-nek önmagában van-e mérhető hatása az izom-kontrakció erejére? Kísérleteinket elvégeztük mind az EDL, mind a Sol izmokon. A mérésre kerülő minták 5 Q10 kezelt és 10 kontroll állatból származtak.

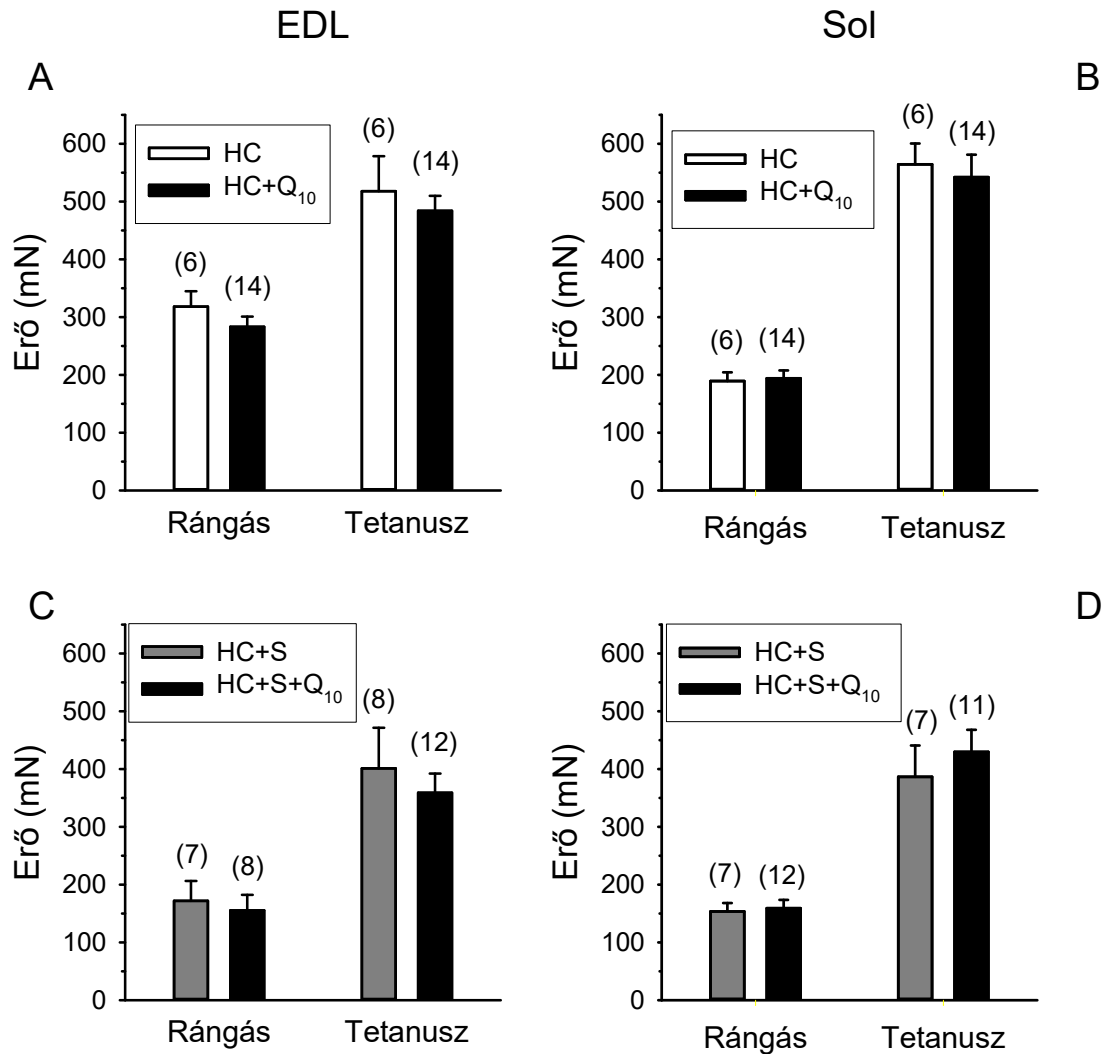
Nem találtunk szignifikáns különbséget az izomerőben: sem a twitch, sem a tetanusz átlagos amplitúdójában a Q10 diétát fogyasztó állatok és a kontroll állatok között egyik izomtípuson sem (28. ábra). Szintén nem volt szignifikáns különbség a twitch/tetanusz arányban sem a Q10 kezelésben részesülő és a kontroll állatok között (nem közölt adat).



28. ábra. Kontroll és Q10 kezelt patkányok izolált vázizmain mért erő-tranziensek *A twitch* átlagos kinetikája az EDL (A) és a Sol (B) izmokon. *A tetanusz* átlagos kinetikája az EDL (C) és a Sol (D) izmokon. *A twitch* (E) és *tetanusz* (F) maximális izomereje, átlag. Zárójelben az egyes csoportokban mérésre került izmok darabszáma került feltüntetésre.

Megvizsgáltuk azt is, hogy a koenzim Q10 adagolásnak milyen hatása van hypercholesterinaemiás körülmények között, illetőleg statinkezelés mellett (29. ábra). Nem

találtunk szignifikáns változást a twitch vagy a tetanusz amplitúdókban a HC és HC+Q10 csoport között. A hyperkoleszterinaemiás, statinkezelt állatok csoportjához viszonyítva sem igazolódott szignifikáns mértékű különbség a HC+S+Q10 csoportok izomerő eredményeiben.



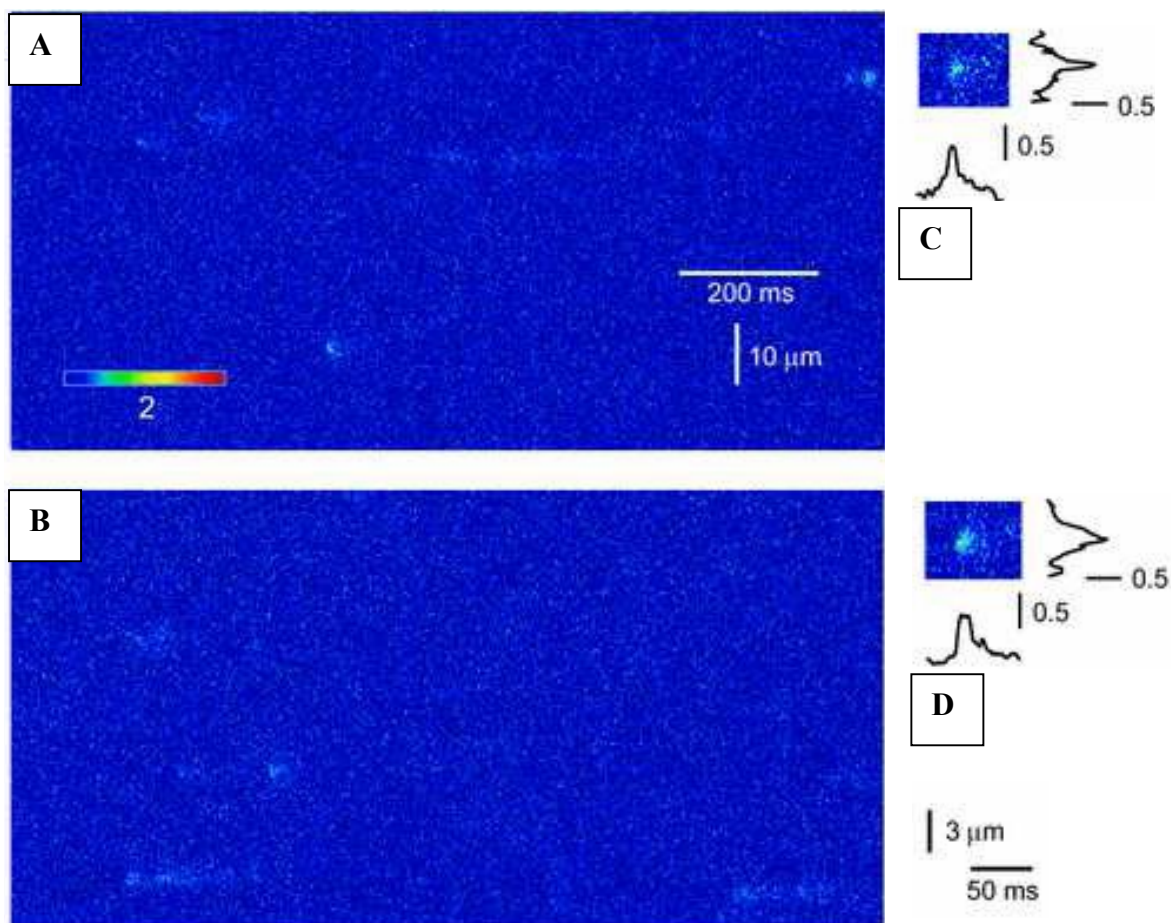
29. ábra. HC, S és Q10 kezelt patkányok izolált vázizmain mért maximális erő átlagok Hyperkoleszterinaemiás diéta mellett önmagában (A, B) és fluvastatin kezeléssel kombináltan (C, D) alkalmazott Q10 kezelés hatására az izolált vázizmokon mért maximális izomerők átlagos értékei. EDL (A, C) és Sol (B, D) izmon mért twitch és tetanusz maximális izomereje, átlag. Zárójelben a mért izmok száma található.

Nem találtunk szignifikáns eltérést a kontrakciók időbeli lefutásában sem: az időtartam és a TTP értékei sem különböztek egymástól statisztikailag jelentős mértékben egyik kezelés-pár kombinációban sem (nem közölt adat).

Összességében megállapíthatjuk, hogy eredményeink alapján nem találtunk szignifikáns mértékű hatást sem a gyors, sem a lassú izmok kontrakciójában a Q10 kezelés mellett, sem a kontrakciók kinetikájában, sem a kontrakciós erőben. A fluvastatin tartalmú diéta eredményeit sem befolyásolta a koenzim Q10 jelenléte a diétában.

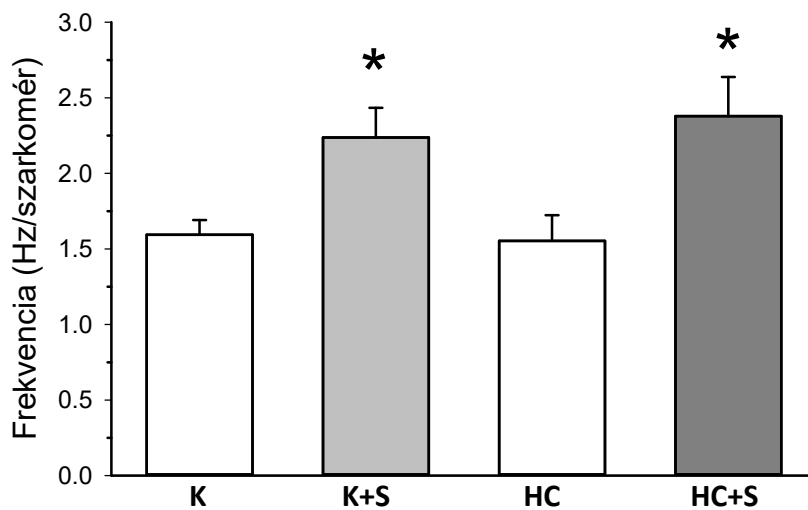
6. Az elemi kalcium-felszabadulási események vizsgálatának eredményei

Irodalmi adatok szerint az akut simvastatin alkalmazása megváltoztatja a kalcium sparkok megjelenését (Sirvent és mtsai 2005), ezért mi is megvizsgáltuk a tartós fluvastatin kezelés hatását a spontán kalcium-felszabadulási eseményekre (30. ábra).



30. ábra: Spontán kalcium-felszabadulási események K és S kezelési csoportokban. A: Kontroll, **B:** Statin-kezelt állatok FDB izmairól készült konfokális, line scan képek. Reprezentatív sparkok és térbeli és időbeli profiljuk a kontroll (C) és a statin-kezelésben részesülő állatok (D) képein. A térbeli és időbeli profilt öt egymást követő sor/oszlop átlagából számoltuk az esemény maximumán. Az adatrögzítés a következő paraméterek mellett történt: 1024x512 pixel, 1,53 ms/vonal, 0,14 μm/pixel; T: 22°C.

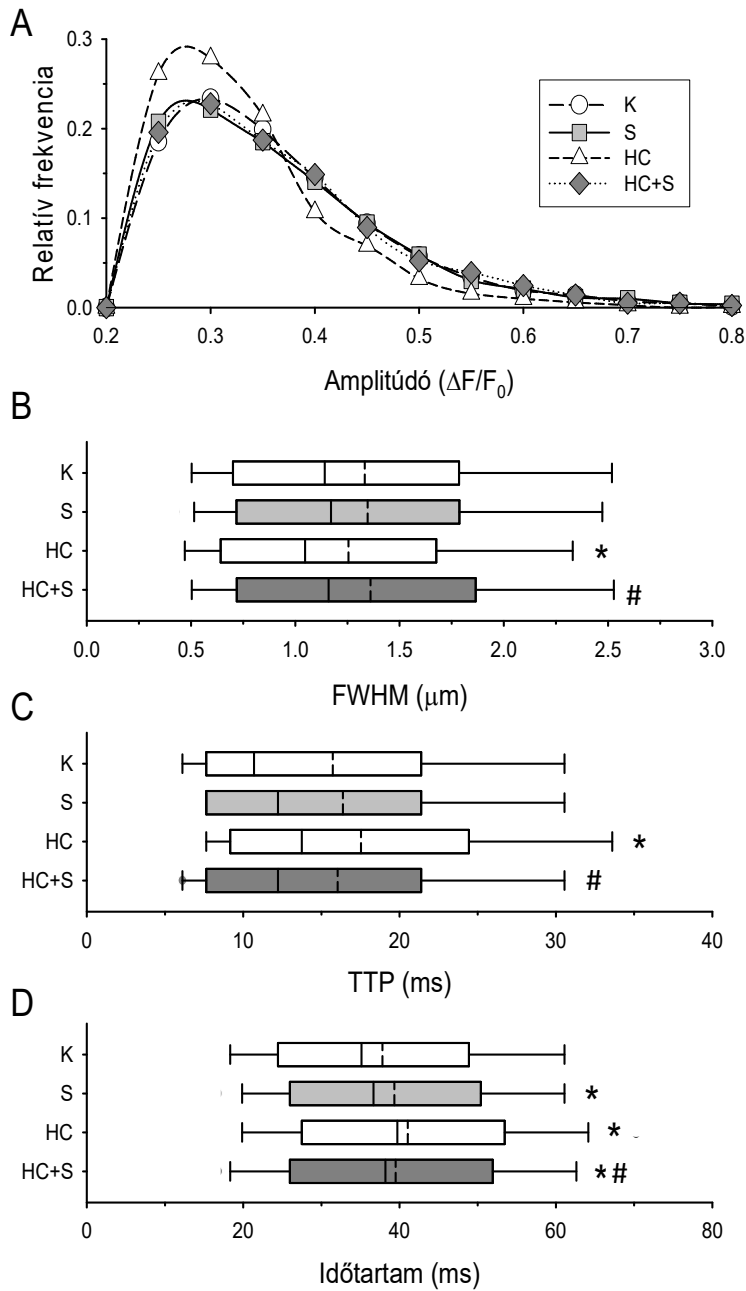
Első lépésben a fluvastatin hatását a kontroll diétával vetettük össze. Eredményeink szerint a statin kezelt (S) állatokból izolált FDB izomrostokon több elemi kalcium-felszabadulási eseményt (sparkot) tudtunk detektálni, mint a kontroll állatok rostjain: szignifikánsan ($p = 0,033$) magasabb volt a kalcium-spark frekvencia a kontrollhoz képest. A statin-kezelésben részesült csoportban $2,24 \pm 0,2$ Hz/sarcomer volt a kalcium-spark frekvencia, $n = 17$. A kontroll csoportban ezzel szemben csak $1,59 \pm 0,1$ Hz/sarcomer volt a sparkok előfordulási gyakorisága, $n = 21$ (31. ábra).



31. ábra: A kalcium- sparkok gyakorisága izolált vázizom-rostokon. A kalcium- sparkok gyakorisága izolált FDB izomrostokon mért képek alapján számolva. Csillaggal jelöltük a szignifikáns ($p < 0,05$) különbséget a statinkezelésben nem részesült csoporthoz képest.

A kalcium- sparkok morfológiai jellemzőit: időbeli és térbeli kiterjedését is összehasonlítottuk a különböző kezelési csoportokban. A legtöbb paraméterben (amplitúdó, FWHM, TTP) nem tapasztaltunk szignifikáns mértékű különbséget a kontroll diéta és a fluvastatin kezelés között (32. ábra A,B,C panel)

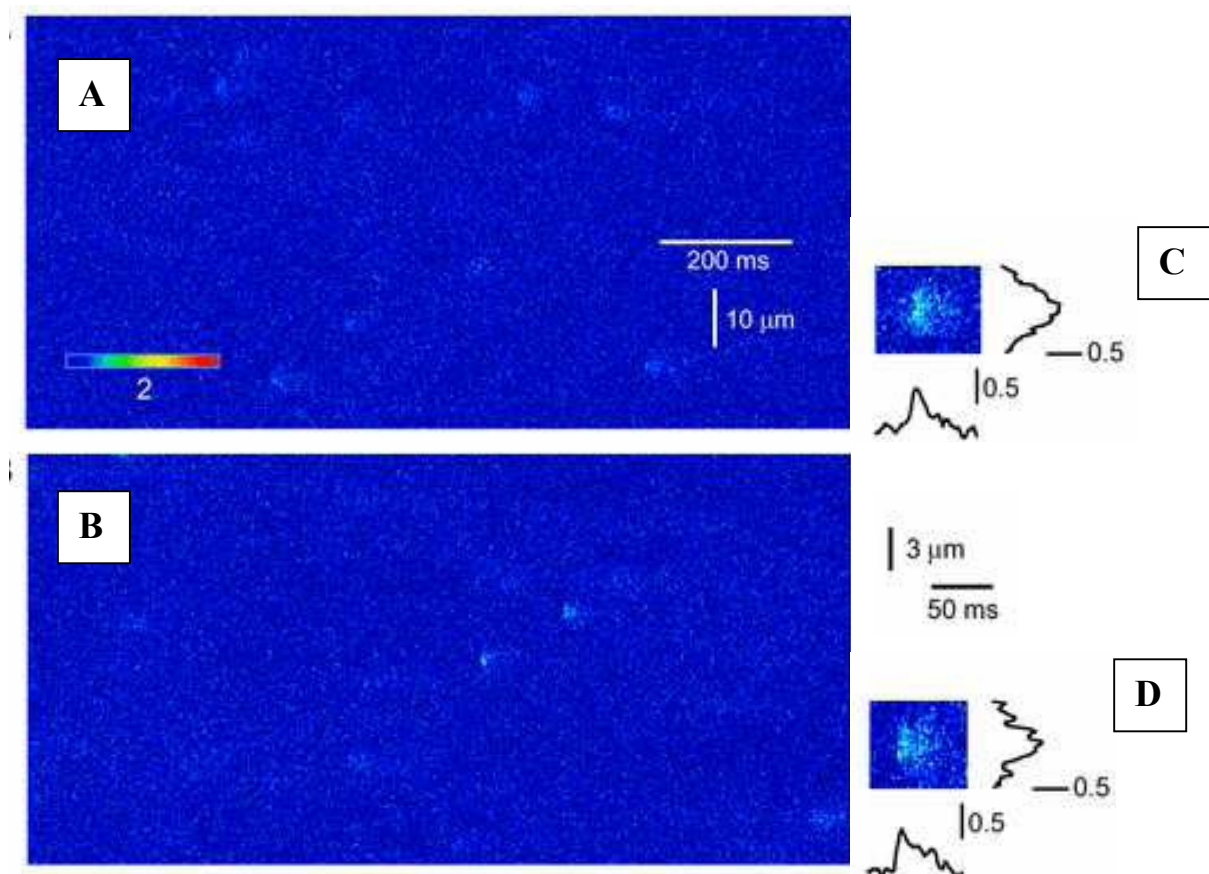
Ki szeretnénk emelni, hogy kismértékű, de szignifikáns ($p = 0,002$) eltérést tapasztaltunk a detektált sparkok időbeli hosszában. A statinkezelésben részesült állatok izomrostjain mért sparkok hosszabbak voltak a kontrollhoz képest: $39,3 \text{ ms} \pm 0,3$, $n = 3962$, míg a kontroll diéta mellett a sparkok hossza átlagosan $37,8 \pm 0,4$ ms-nak adódott, $n = 1605$ (32. ábra, D).



32. ábra: Az egyedi kalcium-felszabadulási események paramétereit. **A:** Az egyedi kalcium- sparkok átlagos amplitúdóértékei a relatív frekvencia függvényében. **B, C, D:** a sparkok FWHM (B), TTP (C) és időtartam (D) értékei a különböző kezelési csoportokban, horizontális box plot formában. Az átlag (szaggatott vonal) és a medián (folytonos vonal) mellett az első és harmadik kvartilis ábrázolódik a vízszintes tengelyen, a hiba az 5 és a 95% percentilis értékeket jelöli. A 0,1 $\Delta F/F_0$ -nél kisebb amplitúdójú és a 0,3 μm -nél kisebb FWHM értékkel rendelkező eseményeket nem vettük bele az elemzésbe. * $p < 0,05$ a normál koleszterin-szinttel rendelkező vs. hyperkoleszterinaemiás kezelési csoport-párok, # $p < 0,05$ a statinkezelést kapott vs nem kapott kezelési csoport-párok.

Eredményeink alapján megállapítottuk, hogy a fluvastatin emeli a kalcium- sparkok frekvenciáját, míg az egyes sparkok morfológiai paramétereit (amplitúdó, FWHM, TTP, duration) alig befolyásolta.

Mivel a statinkezelés legfőbb indikációja a hyperkolesterinaemia kezelése, ezért célszerű a statinkezelés lehetséges mellékhatásait is ezen a populáción vizsgálni. Így következő körben tisztáztuk, hogy a magas koleszterin-szintnek (33. ábra) önmagában van-e hatása az elemi események előfordulására?



33. ábra: Spontán kalcium-felszabadulási események HC és HC+S kezelési csoportokban. HC (A) és HC+S (B) kezelésben részesült patkányok FDB-rostjain detektált line scan konfokális képek. Reprezentatív sparkok térbeli profillal és időbeli lefutással jellemezve HC (C) és HC+S (D) rostokon detektált képekről. Az adatrögzítés paramétere: 1024x512 pixel, 1,53 ms/vonal, 0,14 μm/pixel; T= 22 °C.

Méréseink alapján azt mondhatjuk, hogy a hyperkolesterinaemiás állatokból izolált FDB rostokon nem találtuk szignifikáns eltérést a sparkok frekvenciájában a kontroll (normál koleszterin szinttel rendelkező) patkányokhoz képest: a HC kezelés hatására az átlagos spark-

frekvencia $1,55 \pm 0,17$ Hz/sarcomer-nek adódott, $n = 21$, vs. a kontroll csoportban $1,59 \pm 0,1$ Hz/sarcomer, $n = 21$, $p = 0,871$ (31. ábra).

A kalcium- sparkok morfológiája ellenben az összes, általunk vizsgált paraméter mentén kismértékű, de statisztikailag szignifikáns eltérést mutatott. A HC állatok spark-amplitúdója alacsonyabb volt a kontrollhoz képest (HC: $0,31 \pm 0,002$, $n = 2239$, vs. K: $0,34 \pm 0,003$, $n=1667$, $p < 0,001$) (32. ábra, A). A kalcium sparkok térbeli kiterjedése (FWHM) is szignifikánsan kisebb volt a HC izomrostokban: (HC: $1,25 \pm 0,02$ μm vs. K: $1,33 \pm 0,02$ μm , $p = 0,002$) (32. ábra, B). A HC állatok rostjain detektált sparkok szignifikánsan hosszabb idő alatt érték el az amplitúdó-maximumot, tehát a rise time értéke szignifikánsan hosszabb volt (HC: $17,5 \pm 0,3$ vs. K: $15,7 \pm 0,3$ ms, $p < 0,001$) (32. ábra, C). Emellett az elemi események teljes időtartamának értéke is szignifikánsan nagyobb volt a HC állatok esetén a kontrollhoz viszonyítva (HC: $41,1 \pm 0,4$ vs. K: $37,8 \pm 0,4$ ms, $p < 0,001$) (32. ábra, D).

Összességében azt tapasztaltuk, hogy a HC diéta hatására a kalcium- sparkok térben és intenzitásban kisebbek, emellett időben hosszabbak (lassabbak); de ugyanolyan gyakorisággal fordulnak elő, mint a kontroll állatok sparkjai.

Tehát véleményünk szerint a hyperkoleszterinaemiás állapot befolyásolja a kalcium- sparkok morfológiáját (amplitúdó, FWHM, TTP, duration), de az elemi kalcium-felszabadulási események frekvenciájára nincs hatással.

Ezt követően megvizsgáltuk a fluvastatin hatását a HC diéta mellett. A statinkezelt hyperkoleszterinaemiás patkányok izolált rostjain szignifikánsan nagyobb volt a kalcium-sparkok frekvenciája (HC+S: $2,38 \pm 0,26$ Hz/sarcomer, $n=18$, vs. HC: $1,55 \pm 0,17$ Hz/sarcomer, $n = 21$, $p = 0,006$) (31. ábra), tehát ugyanolyan irányú változást tapasztaltunk, mint a nem- hyperkoleszterinaemiás állapotban alkalmazott statinkezelés esetén.

A morfometriai paraméterek tekintetében azt kaptuk eredményül, hogy a HC+S rostokon mért sparkok amplitúdója szignifikánsan ($p < 0,001$) nagyobb volt a HC csoporthoz viszonyítva (HC: $0,31 \pm 0,002$ vs. HC+S: $0,35 \pm 0,002$) (32. ábra, A). Emellett a térbeli félérték-szélesség (FWHM) is szignifikánsan ($p < 0,001$) magasabb volt (HC: $1,25 \pm 0,02$ vs. HC+S: $1,36 \pm 0,02$ μm) (32. ábra, B). A TTP értéke szignifikánsan ($p < 0,001$) csökkent a statinkezelés hatására (HC: $17,5 \pm 0,3$ vs. HC+S: $16,0 \pm 0,2$ ms) (32. ábra, C), és az események időbeli hossza (duration) is szignifikánsan ($p = 0,003$) rövidebb lett a HC diétához viszonyítva (HC: $41,1 \pm$

0,4 vs. HC+S: $39,5 \pm 0,3$ ms) (32. ábra, D). A $0,1 \Delta F/F$ -nél kisebb amplitúdójú és a $0,3 \mu\text{m}$ -nél kisebb FWHM értékkel rendelkező eseményeket nem vettük bele az elemzésbe.

Összességében a fluvastatinnal kezelt hypercholesterinaemiás állatok mintáin mért sparkok amplitúdója magasabb, térbeli kiterjedése szélesebb és az időbeli lefutása rövidebb volt a hypercholesterinaemiás állatokon detektált kalcium-sparkokhoz viszonyítva. Azonban ha a normál koleszterin-szinttel rendelkező, statin-kezelt patkányokhoz viszonyítottuk a HC+S sparkok értékeit, akkor nem találtunk szignifikáns különbséget a kalcium- sparkok morfometriai paramétereiben.

Ezen eredmény birtokában úgy véljük, hogy a fluvastatin kezelés visszafordította vagy semlegesítette a hypercholesterinaemia által generált változásokat a sparkok morfológiájában (32. ábra).

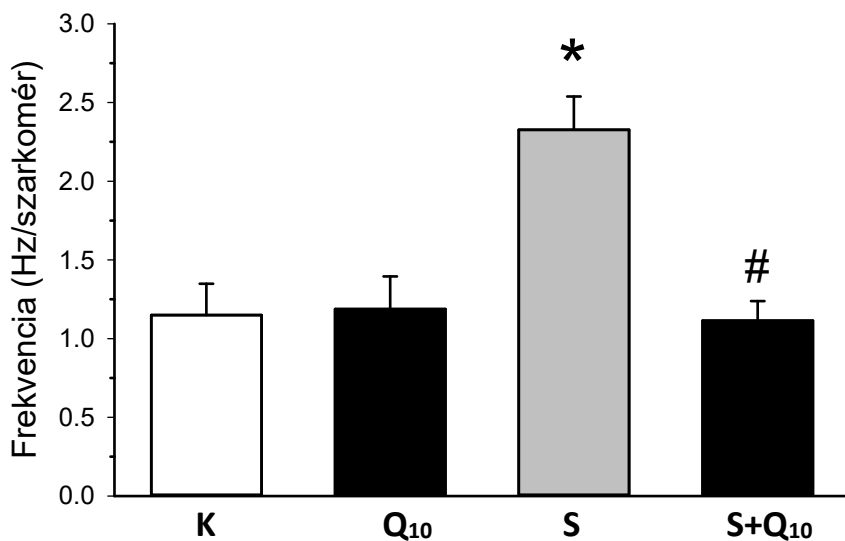
Ezt követően megvizsgáltuk azt is, hogy a koenzim Q10 adagolásnak van-e hatása a spontán kalcium-felszabadulási eseményekre a patkányok izolált FDB rostjain, és vajon a fluvastatin által okozott hatásokat képes-e antagonizálni?

Eredményeink alapján nem találtunk szignifikáns különbséget a kalcium- sparkok frekvenciájában a kontroll diétával táplált és a Q10-el kezelt állatok között (K: $1,15 \pm 0,2$ Hz/sarcomer $n = 11$, vs. Q10: $1,19 \pm 0,21$ Hz/sarcomer, $n = 11$, $p = 0,989$) (34. ábra).

Miután azt tapasztaltuk, hogy a koenzim Q10 adagolásnak önmagában nem volt hatása a kalcium- sparkok gyakoriságára, megvizsgáltuk, hogy képes-e ellensúlyozni, és ha igen, milyen mértékben a fluvastatin-kezelés hatására tapasztalt, a sparkok gyakoriságában észlelt változásokat?

A kombinált, Q10+S kezelésben részesülő állatok izolált FDB rostjain kevesebb kalcium-sparkot detektálunk, mint a csak fluvastatinnal kezelt rostokon, tehát szignifikánsan ($p = 0,001$) alacsonyabb spark-frekvenciát mértünk a S csoporthoz képest (S+Q10: $1,11 \pm 0,12$ Hz/sarcomer, $n = 12$, vs. S: $2,33 \pm 0,21$ Hz/sarcomer, $n = 15$). (34. ábra)

Eredményeink alapján azt mondhatjuk, hogy a S+Q10 csoportban a sparkok frekvenciája ($1,11 \pm 0,12$ Hz/sarcomer) a kontroll csoportnak megfelelő tartományba csökkent ($1,15 \pm 0,2$ Hz/sarcomer).

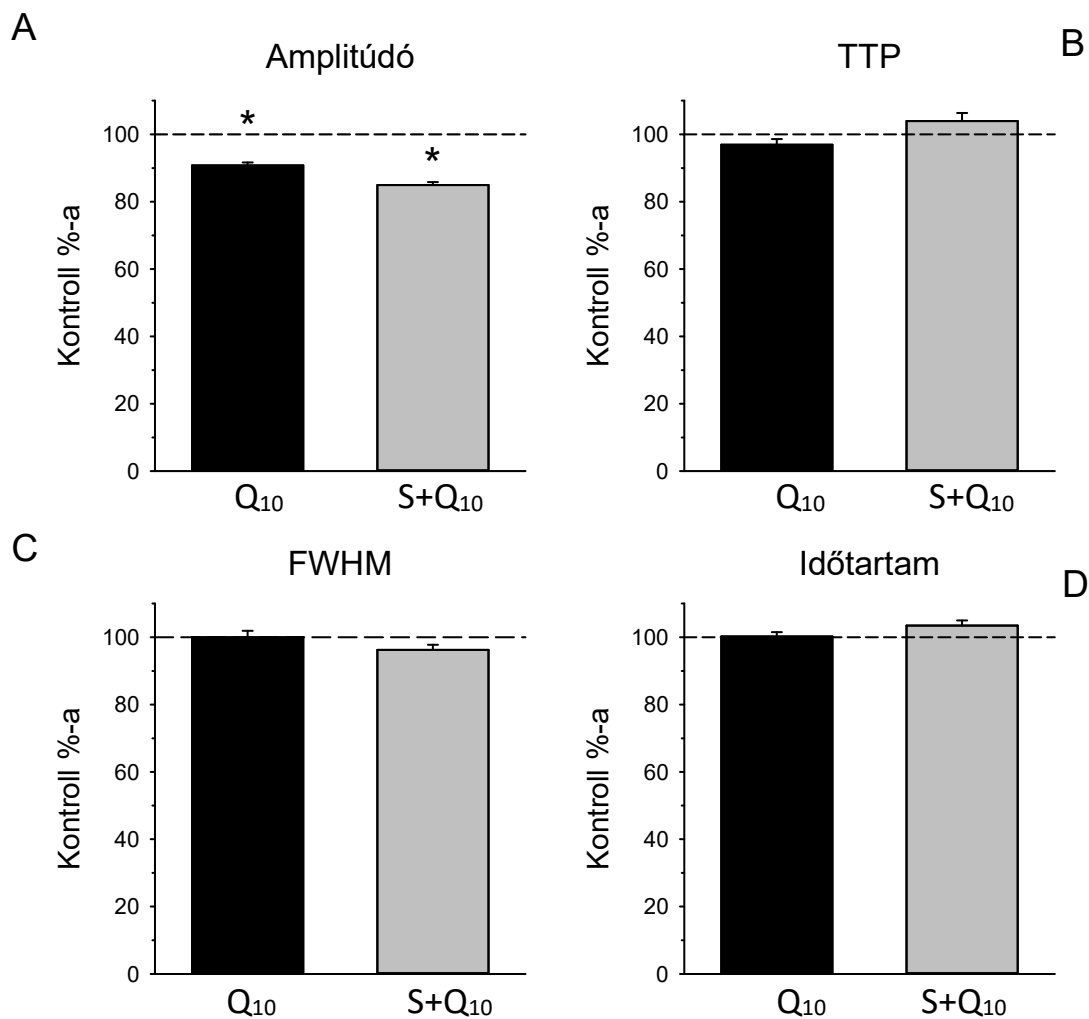


34. ábra: Kalcium- sparkok gyakorisága Q10 diéta mellett. A kalcium- sparkok gyakorisága izolált FDB izomrostokon mért képek alapján számolva. *: $p < 0,05$ vs. K, #: $p < 0,05$ vs. S.

Elemeztük a Q10 kezelés hatását a sparkok morfológiai paramétereire is. Azt tapasztaltuk, hogy az elemi események amplitúdója szignifikánsan csökkent a Q10 kezelés hatására, a Q10 csoportban kontroll érték 90,8%-át mértük (89,0-92,6%, $p < 0,001$) (35. ábra, A).

A sparkok egyéb paramétereiben nem találtunk szignifikáns különbséget a két kezelési csoport között. A Q10 csoportban a rise time a kontroll 96,9% volt (95% CI: 93,6–100,2%, $p = 0,1412$) (35. ábra, B). Az FWHM értéke a kontroll diéta mellett mért érték 100,3 %-a volt (95% CI: 96,4–104,2%, $p = 0,3202$) (35. ábra, C). A sparkok átlagos időtartama a kontroll érték 100,3%-ának adódott méréseink során (95% CI: 97,8–102,7%, $p = 0,3049$) (35. ábra, D).

Tehát összefoglalva azt tapasztaltuk, hogy a koenzim Q10 adagolás jelenléte befolyásolta a spark-amplitúdót.



35. ábra. Koenzim Q10 kezelés hatása az elemi kalcium-felszabadulási eseményekre. *Izolált vázizom rostokon detektált elemi események morfolometriai paraméterei, kontroll diéta mellett alkalmazott Q10 és statin+Q10 kezelés hatása. Az értékeket átlagolás után a kontroll diéta eredményeire normalizáltuk (szaggatott vonallal jelölve). A: Amplitúdó, B: TTP, C: FWHM, és D: időtartam. *: $p < 0,05$ vs. az adott diéta Q10 kezelés nélküli párja.*

Majd megvizsgáltuk a Q10 kezelés hatását az elemi kalcium-felszabadulási események morfolometriai paramétereire statinkezelés mellett is. A statin-kezelt állatok esetében a koenzim Q10 ugyanolyan hatást váltott ki, mint a kontroll diéta mellett adagolva; nevezetesen az amplitúdó kis mértékben csökkent, míg az összes többi paraméter nem változott szignifikáns mértékben (35. ábra).

Tehát összességében azt tapasztaltuk, hogy a koenzim Q10 adagolása kivédte a fluvastatin spark-frekvenciára gyakorolt hatását.

V. Diszkusszió, következtetések

1. Állatmodell

Munkánk során egy, a hypercholesterinaemia kezelésére használt gyógyszer, a fluvastatin vázizomzatra kifejtett hatásait vizsgáltuk. A statin-asszociált miopátia gyakoribb (a statin-szedők 9-20%), mint amit a klinikai tanulmányok közölnek (1-5%), és gyakran a gyógyszeresedés felfüggesztéséhez vezet (1 éves kezelés mellett 50%). Ezáltal ezek a betegek elesnek a statinok koleszterin-csökkentő, továbbá kardiovaszkuláris morbiditásra és mortalitásra kifejtett jótékony hatásától (*Buettner és mtsa 2008*). Azon betegeknél is ultrastukturális vázizomkárosodást lehet kimutatni, akiknek nincsenek miopátiás panaszaik (*Draeger és mtsai 2006, Mohaupt és mtsai 2009*)

Első lépésben létrehoztunk egy olyan állatmodellt patkányokon, ami megfelelően magas szérumszinttel rendelkezik ahhoz, hogy a humán viszonyokat jó tudja modellezni. Alapvetően a rágcsálók esetében nem könnyű feladat tartós hypercholesterinaemiás állapotot előidézni; például az érrelmeszesedés jellemzően nem fordul elő körükben.

Az irodalomban fellelhető állatmodellekhez viszonyítva a mi modellünkben elért koleszterin szérumszintje jelentősen magasabb, ami sokkal jobban tükrözi a humán viszonyokat. Az irodalomban talált diéták 1-4%-ban tartalmaztak koleszterint. Ilyen étrend használatával kb. két-ötszörös koleszterin koncentráció-emelkedést tapasztaltak a szérumban. (*Santillo és mtsai 1999, Lee és mtsai 2007, Lu és mtsai 2007, Adameová és mtsai 2007*) Mások önmagában a pajzsmirigy-működés gátlását alkalmazták. Azonban az ily módon elért szérumszint koncentráció emelkedésének mértéke még alacsonyabb volt (maximum az adott állatfaj normál értékének kétszerese). (*Santillo és mtsai 1999, Mochizuki és mtsai 1999,*)

Mi a két módszer kombinációját alkalmaztuk, így kb. nyolcszoros emelkedést tapasztaltunk a kontrollhoz képest. Azonban ismert, hogy a pajzsmirigy-működés gátlásának vázizomkárosító hatása lehet, ezért létrehoztunk a kezelésmentes kontroll mellett egy olyan kontroll csoportot, amely állatok csak a pajzsmirigy-működést gátló tiouracylt kapták, és a hypercholesterinaemiás kezelési csoportokban ezt használtuk kontrollnak, amiatt, hogy a pajzsmirigy-funkció gátlás vázizomra kifejtett hatását meg tudjuk különböztetni az általunk vizsgált anyagok hatásától. Eredményeink alátámasztják, hogy az általunk észlelt vázizom-

károsodás a fluvastatinnak köszönhető és nem hozható összefüggésbe az állatok hypothyreoid státuszával.

2. Myopathia

A statin indukálta miopátia magyarázatára az irodalomban számos teória látott napvilágot (pl. *Sirvent és mtsai 2008*), amik az általunk tapasztaltakat is magyarázhatják: nevezetesen a megváltozott nyugalmi $[Ca^{2+}]_i$ -t, a csökkent izomerőt és a gátolt myotubulus fejlődést.

A fluvastatin adagolása mellett a vázizom-károsodás mértékét kívántuk felmérni. A kísérleteink során a vázizomrostok átmérőjének és izomerejének csökkenése alapján kimondhatjuk, hogy az általunk alkalmazott fluvastatin kezelés miopátiát okozott. A statinkezelt hypercholesterinaemiás állatok vázizomrostjainak magasabb volt a nyugalmi $[Ca^{2+}]_i$ -ja, ami szintén alátámasztja a vázizom-károsodás jelenlétét. Emellett a speciális izomkárosodás marker, a CK emelkedett értéke is megerősíti a miopátia fennállását.

Ha a különböző statin asszociált myopathia klasszifikációkat használva értékeljük az általunk kapott eredményeket, azonos következtetésre juthatunk.

A Statin Muscle Safety Task Force besorolása alapján kimondhatjuk a miopátia jelenlétét az igazolt izomgyengeség miatt, melyet enyhe fokú izomnekrózis kísér a mérsékelt CK emelkedés miatt.

Az Európai Atherosclerosis Társaság kritériumai alapján SAMS + minor CK emelkedés kategóriába sorolható az eredményünk, melynek okaként a szóba jövő lehetőségek közül a statin kezelés mellékhatása igazolható, mint egyedüli eltérés a többi kezelési csoporthoz viszonyítva.

Így tehát mindkét besorolás szerint igazolódott a statin asszociált miopátia jelenléte, és a vázizom károsodás funkcionálisan és biomarker szinten is megerősítésre került.

Másrésről primer tenyésztés során a tápközeghez adagolt fluvastatin csökkentette a vázizomsejtek proliferációját és elnyújtotta a differenciáció folyamatát. Ez alapján arra következtetünk, hogy mivel a fentiek alapján bizonyítottan kialakult vázizom-károsodás, ebből fiziológiásan az következne, hogy válaszként beindulnak a regenerációs folyamatok.

A felnőttkori vázizom-regeneráció a rostok lamina basalis alatt elhelyezkedő prekursor sejtekből indul. Az MDSC-k kétféle módon is részt vehetnek a regenerációban: egyrészt közvetlenül beléphetnek a vázizom-differenciáció útvonalba, másrészt szatellita-sejtek képzése révén. Izomkárosodás esetén ezek a nyugvó sejtek aktiválódnak és vázizomrosttá differenciálódnak, és át tudják venni a károsodott rostok funkcióját.

A kísérletünk során azt tapasztaltuk, hogy a fluvastatin adagolás hatására éppen ezek a regenerációhoz szükséges, esszenciális folyamatok blokkolódnak. A gátlás mind a kezdeti lépésben, a sejtproliferáció akadályozása révén, mind az útvonal későbbi elemeiben, a differenciációban tapasztalt elmaradás révén érvényesül.

Így a sejtenyészetben kapott eredményeink alapján azt mondhatjuk, hogy a regeneráció lehetősége elvész a károsodott izmok számára statin kezelésben. (*Mauro 1961, Seale és mtsai 2000, Qu-Petersen és mtsai 2002, Buckingham és mtsai 2003*)

Ennek hátterében feltehetőleg nem a sejtmembrán koleszterin-tartalmának csökkenése áll, mivel ismert, hogy akut koleszterin-depléciónak hatására (M β CD segítségével) a primer tenyésztett csirke-vázizomsejtek proliferációja fokozódik: mononukleáris, dezmin-pozitív sejtek száma, és a sejtek dezmin-expressziója is kifejezettebb. A M β CD hatására fokozódik a p53 expresszió, és a MyoD1 expresszió is. (*Portilho és mtsai, 2012*)

A kalcium-homeosztázis változásait korábban is összefüggésbe hozták a statin-indukálta miopátiával (*Sacher és mtsai 2005*). A T-tubulus rendszer strukturális gyengeségét is leírják statin-kezelésben részesülő betegek esetében (*Draeger és mtsai 2006*), nevezetesen, hogy a T-tubulusok a koleszterin-depléciónak hatására sokkal sérülékenyebbek, mint a sarcolemma vagy az SR egyéb részei. Ismert továbbá, hogy akut fluvastatin kezelés befolyásolja a kalcium-spark aktivitást vázizomrostokon (*Sirvent és mtsai 2005*). Statin-asszociált miopátiában szenvedő betegek vizsgálata során a RyR3 receptor up-regulációját mutatták ki (*Draeger és mtsai 2010*). A RyR 3-as izoformája érzékenyebb a kalcium általi aktivációra, így a harántcsíkolt izomban történő overexpressziója emelkedett nyugalmi intracelluláris kalcium-koncentrációhoz vezet (*Legrand és mtsai 2008*).

A fentiekkel egybehangzó módon a mi vizsgálataink során is határozottan emelkedett nyugalmi, [Ca²⁺]_i-t detektáltunk a tartósan fluvastatinnal kezelt állatok vázizomrostjaiban. Ez az eredmény vázizom-károsodás jelenlétére utal, ahogyan azt a statin-kezelt állatok emelkedett szérum CK értéke alapján vártuk. Fluvastatin adagolás mellett a maximálisan

elérhető izomerő jelentősen csökkent mind a lassú, mind a gyors izmokon; mind a twitch, mind a tetanusz esetén. Meg kell azonban jegyeznünk, hogy emellett a fluvastatin kezelés hatására a vázizomrostok, és összességében az izom átmérőjének csökkenését tapasztaltuk. Az átmérőkre történő normalizálást követően nem találtunk szignifikáns különbséget a statin-kezelt és a kontroll állatok izomereje között. Ez azt sugallja, hogy a statin kezelés nem azt befolyásolja, hogy az aktiváció hatására milyen módon alakulnak ki a keresztkötések, hanem elsődlegesen az izomszövet-vesztés állhat a csökkent izomerő hátterében. Azonban a csökkent kontrakciós erő mellett a kontrakciók időbeni lefutása is megváltozott a tartós fluvastatin-kezelés hatására, elsősorban a lassú, Sol izmok esetében. A jelentősen rövidebb kontrakciós idő az izom-aktivációs folyamatban történő változásra utal.

3. Elemi események

Kimutattuk, hogy a hypercholesterinaemiás patkányok esetében a magas szérum koleszterin koncentráció nem befolyásolta a spontán kalcium-fel szabadulási események frekvenciáját, de az egyes sparkok kisebbek és lassabbak lettek. Az emelkedett szérum koleszterin koncentráció a sejtmembránokban is emeli a koleszterin-tartalmat (*Somodi és mtsai 2013*). Egy korábbi, mesterségesen koleszterin-szegény membránú szív- és simaizom sejteken végzett tanulmány kimutatta (*Löhn és mtsai 2000*), hogy a membrán koleszterin tartalma befolyásolja a kalcium- sparkok paramétereit. Ez alapján úgy véljük, hogy a mi kísérleteink során észlelt spark-jellemzők változása leginkább a membrán megváltozott fluiditásával áll összefüggésben, ami a patkányok koleszterin-dús táplálása miatt emelkedett szérum koleszterin következménye. Meg kell jegyeznünk azonban, hogy kísérleteink során az izolált vázizom-rostok sejt felszíni membránját permeabilizáltuk egy rövid saponinos kezelés segítségével. A saponin a lipid kettős rétegek koleszterin tartalmával lép interakcióba (*Bangham és mtsai 1962*), és úgy permeabilizálja a membránt, ezért elképzelhető, hogy a saponin hatása kissé más volt az eltérő szérum koleszterin-szinttel rendelkező állatok esetében, mivel a hypercholesterinaemiás patkányok sejt felszíni membránjában emelkedhetett a koleszterin tartalom. Bár úgy véljük, hogy ez a lehetséges különbség elhanyagolható hatással bírhatott az eredményeinkre, a következtetéseink során mégis figyelembe vesszük ezt a lehetőséget is. Mivel eredményeink egybevágnak a fent idézett szív- és simaizom adatokkal, ez megerősíti azt a nézetünket, hogy önmagában a saponin kezelésnek elhanyagolható hatása volt a kalcium sparkok egyedi paramétereire.

A fluvastatin kezelés emelte a spontán kalcium sparkok frekvenciáját, ezt a hatást következetesen ki tudtuk mutatni mind a normál szérum koleszterin szinttel rendelkező, mind a hypercholesterinaemiás patkányok vázizmain. A fluvastatin kezelés azonban nem változtatta meg a sparkok egyedi karakterisztikáját, kivéve az időbeli hosszukban bekövetkező kis eltérést. A statin-asszociált miopátia kialakulásának hátterében az intracelluláris kalcium jelátvitel érintettségét régóta feltételezik. Kimutatták, hogy a simvastatin intracelluláris kalcium-tranzienseket triggerel egészséges humán vázizom-sejteken (*Sacher és mtsai 2005*), továbbá, hogy fokozza az SR-ből történő kalcium-szivárgást (*leaking*) egészséges és RyR mutáns egerek izolált vázizmain (*Knoblauch és mtsai 2013*). A Simvastatin akut, *in vitro* alkalmazása során a kalcium homeosztázis zavarát írták le, és megnövekedett a sparkok amplitúdója mind egészséges humán, mind patkány izmokon (*Sacher és mtsai 2005, Sirvent és mtsai 2005*). A mi kísérleteink során azonban a hosszú távú fluvastatin alkalmazása nem befolyásolta szignifikáns mértékben a sparkok amplitúdóját. Az eltérést jól magyarázhatja a gyógyszer eltérő adagolási módja (akut, *in vitro* alkalmazás vs. 4 hétig tartó *in vivo* alkalmazás). Lehetséges, hogy a statinok spark-amplitúdóra kifejtett hatása függ a kezelés hosszától és intenzitásától, ez mégsem magyarázza egyértelműen, hogy miért növekedett meg a spark frekvencia a fluvastatin kezelt csoportunkban. Úgy véljük, hogy a fajok közötti különbség állhat a jelenség hátterében, mivel a mi eredményeinkkel összhangban lévő eredményeket publikált nemrég egy munkacsoport (*Lotteau és mtsai 2015*), akik hasonló patkány modellt használtak: statin kezelés hatására emelkedett a sparkok frekvenciája és időbeli hossza; míg miopátiás panaszokkal rendelkező statin-kezelt betegeknél csökkent kalcium-spark frekvenciát találtak (*Sirvent és mtsai 2012*). Érdekes, hogy a panaszmentes statin-szedő betegek esetén nem találtak változást a sparkok frekvenciájában; ez alapján feltételezhető, hogy a kalcium-homeosztázisnak szerepe van a statin-indukált miopátia kialakulásában. Fontos megjegyeznünk, hogy az emelkedett spark-frekvenciát minden kezelési csoport-párban (ahol egyedül a fluvastatin adagolás jelentett különbséget a diéták között) észleltük kísérleteink során (kivéve a Q10-tartalmú diétás párokat, ld. később). Ennélfogva a mi vizsgálati modellünkben ezt az eredményt tekintjük a legspecifikusabb fő változásnak, amit a fluvastatin adagolása okozott.

Az általunk használt állatmodellben a fluvastatin kezelés a hypercholesterinaemiás patkányok szérum koleszterin koncentrációját lecsökkentette a kontroll értékre. Ezért lehetséges, hogy a HC és a HC+S csoportok között mért különbség az egyes sparkok paramétereiben (amplitúdó, időtartam, stb.) nem a fluvastatin direkt hatása, inkább a koleszterin szint csökkenés

eredményének a hatása lehet, mivel a HC+S sparkok a kontroll körülmények között mért sparkokhoz hasonlóak.

A koenzim Q10 kiegészítő adagolása során legfontosabb hatásként azt tapasztaltuk, hogy a fluvastatin kezelt patkányok vázizmain szignifikánsan csökkent a spontán kalcium-felszabadulási események frekvenciája. Tehát a Q10 adagolása kivédte a fluvastatin spark-frekvencia fokozó hatását, azonban az egy elemi esemény során felszabaduló kalcium mennyiségére nem volt hatással. Feltételezve, hogy a kalcium homeosztázis változása, vagy pontosabban a kalcium- sparkok frekvenciájának változása összefüggésbe hozható a statin-indukálta miopátia kialakulásával, eredményeink azt támasztják alá, hogy a koenzim Q10 kiegészítő adagolása csökkentheti a patológiás izom-elváltozások kialakulásának esélyét a statint (elsősorban fluvastatint) szedő betegek körében, azáltal, hogy kivédi vagy megelőzi a koleszterin-csökkentő gyógyszer által okozott változásokat. Bár a Q10 adagolás klinikai hatékonyságáról ellentmondó eredmények születtek a statin-indukálta miopátia esetében, (*Littlefield és mtsai 2014, Skarlovník és mtsai 2014*), eredményeink arra utalhatnak, hogy a Q10 védő hatást fejthet ki a statin-indukálta vázizom-panaszok megelőzésében.

Mivel kimutatták, hogy permeabilizált vázizom-rostokon a reaktív oxigén-gyökök (ROS) koncentrációjának emelkedése növeli a kalcium- sparkok frekvenciáját (*Isaeva és mtsai 2005*), és ismert, hogy a koenzim Q10 kiegészítés csökkenti a ROS szintet patkány vázizmon (*Kon és mtsai 2007*), eredményeink alapján úgy véljük, hogy a ROS-nak is szerepe van a statin-indukálta miopátia kialakulásában. Azonban eredményeink alapján nem észleltünk a a Q10 adagolásnak makroszkóposan kimutatható izomműködésbeli hatását sem a kontroll, sem a HC vagy HC+S diéták mellett sem.

Összegezve azt tapasztaltuk, hogy a fluvastatin koleszterin-szinttől független módon konzisztensen és specifikusan növelte a kalcium-spark frekvenciát a vázizom-sejteken, és ezt a hatást a diétában lévő koenzim Q10 ki tudta védeni. Ezen eredmények is megerősítik a kalcium-jelátvitel szerepét a statin-indukálta miopátia kialakulásában, emellett magyarázattal szolgálhatnak, hogy a Q10 statinnal történő együttes alkalmazása hogyan képes csökkenteni a miopátiát a panaszos statin-szedő betegek körében.

Összefoglalás

A statinok a cardiovascularis prevenció hatékony gyógyszerei. A statin-asszociált miopátia patomechanizmusa a mai napig sem tisztázott, amihez a megfelelő állatmodell hiánya is hozzájárulhat. Felvetődik a kalcium-homeosztázis változásainak és a koenzim Q10 (Q10) csökkent koncentrációjának a kóroki szerepe is.

Munkánk során kidolgoztunk egy hyperkoleszterinaemiás (HC) állatmodellt, amivel tanulmányozható a fluvastatin vázizmokra kifejtett hatása. Kísérleteink során tartósan fluvastatinnal és/vagy Q10-el kezeltünk patkányokat, és az izomerőben és a kalcium-homeosztázisban bekövetkező változásokat vizsgáltuk.

A HC állatok szérum-koleszterin koncentrációja több, mint hétszeresére emelkedett a kontrollhoz képest (1.5 ± 0.1 vs. 10.7 ± 2.0 mmol/l; $n = 15$ és 16), és az LDL/HDL arány is megnőtt (0.29 ± 0.02 vs. 1.56 ± 0.17). Ezen változásokat a statin kezelés visszafordította, és egyrészt megemelkedett a szérumban a kreatin-kináz (CK) értéke, ami vázizom-károsodás jelenlétére utal, másrészt az állatok *m. extensor digitorum longus* (EDL) rostjainak keresztmetszeti területe szignifikánsan csökkent. A tenyésztett myotubulusok proliferációs rátája és fúziós képessége is csökkent a statin kezelés hatására, és a szatellita sejtek és myotubulusok nyugalmi intracelluláris kalcium koncentrációja is csökkent. Azonban a kifejlett vázizomrostok nyugalmi intracelluláris kalcium koncentrációját emelte a fluvastatin kezelés (116 ± 4 nM vs. 151 ± 5 nM; $n = 33$ és 34), és mind az EDL, mind a *m. soleus* (Sol) izomereje csökkent (twitch és tetanusz egyaránt). Emellett a Sol izmon a twitch és tetanusz időbeli hossza is rövidült. A HC nem befolyásolta, azonban a fluvastatin kezelés emelte a kalcium-spark-frekvenciát. A Q10 kivédte a fluvastatin ezen hatását, azonban alapvetően nem befolyásolta az egy esemény alatt felszabadult kalcium mennyiségét. Összességében azt tapasztaltuk, hogy a fluvastatin a vér koleszterin koncentrációjától függetlenül, következetesen és specifikusan növelte a vázizomsejtek kalcium-spark frekvenciáját, és ezt a hatást meggátolta a Q10 adagolás.

Eredményeink egyértelműen igazolják a statin kezelés hatására kialakuló miopátia jelenlétét, csökkent izomerővel és emelkedett szérum CK értékkel. Emellett alátámasztják a kalcium-homeosztázis szerepét a statin-asszociált miopátia kialakulásában, és a Q10 izompanaszokkal szembeni protektív hatásában.

Summary

Statins are effective drugs in cardiovascular disease prevention. Although the pathomechanism of statin-induced myopathy is not completely understood, changes in calcium homeostasis and reduced coenzyme Q10 levels are hypothesized to play important roles. However, the lack of an animal model is one of the important drawbacks in studying statin associated myopathy.

In order to study the effects of fluvastatin on skeletal muscle, an animal model with high blood cholesterol level (HC) was developed by our research group. In our experiments, fluvastatin and/or coenzyme Q10 (Q10) was administered chronically to rats, and the modifications of the calcium homeostasis and the strength of their muscles were investigated.

In HC animals cholesterol levels rose more than seven fold (from 1.5 ± 0.1 to 10.7 ± 2.0 mmol/l; n = 15 and 16) with a dramatic increase in low density lipoprotein/ high density lipoprotein ratio (from 0.29 ± 0.02 to 1.56 ± 0.17). While the latter was reversed by statin treatment, an elevation in blood creatine kinase level indicated the presence of muscle wasting, fibers from *m. extensor digitorum longus* (EDL) also showed significant reduction in cross sectional area. Statin treatment also decreased the proliferation and fusion of skeletal myotubes in culture, and resting intracellular calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$) was reduced in satellite cells and myotubes. In adult skeletal muscle fibers statin treatment increased resting $[Ca^{2+}]_i$ (116 ± 4 nM vs. 151 ± 5 nM; n = 33 and 34) and decreased both twitch and tetanic force both in EDL and *m. soleus* (Sol). In addition, in Sol the duration of twitch and tetanic force was shortened. HC did not change, but Fluvastatin increased the spark frequency. Q10 supplementation prevented the spark frequency increasing effect of fluvastatin without having a major effect on the amount of calcium released during individual sparks.

In conclusion, we have found that fluvastatin, independently of the cholesterol level in the blood, consistently and specifically increased the frequency of calcium sparks in skeletal muscle cells, an effect which could be prevented by the addition of coenzyme Q to the diet. These results clearly indicate that statin administration in these animals results in a myopathy characterized by decreased muscle force and elevated plasma CK level. Our results also support theories favouring the role of calcium handling in the pathophysiology of statin-induced myopathy and the protective effect of coenzyme Q in statin treated patients.

Irodalomjegyzék

2019 ESC/EAS guidelines for the management of dyslipidaemias: Authors/Task Force Members; ESC Committee for Practice Guidelines (CPG); ESC National Cardiac Societies.: 2019 ESC/EAS guidelines for the management of dyslipidaemias: Lipid modification to reduce cardiovascular risk. *Atherosclerosis*. 2019 Nov;290:140-205. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2019.08.014. Epub 2019 Aug 31.

Adameová A1, Ravingerová T, Svec P, Faberová V, Kuzelová M.: The myocardial infarct size-limiting and antiarrhythmic effects of acyl-CoA: cholesterol acyltransferase inhibitor VULM 1457 protect the hearts of diabetic-hypercholesterolaemic rats against ischaemia/reperfusion injury both in vitro and in vivo. *Eur J Pharmacol*. 2007 Dec 8;576(1-3):114-21. Epub 2007 Aug 3.

Aguilar HN1, Mitchell BF.: Physiological pathways and molecular mechanisms regulating uterine contractility. *Hum Reprod Update*. 2010 Nov-Dec;16(6):725-44. doi: 10.1093/humupd/dmq016. Epub 2010 Jun 14.

Alfirevic A1, Neely D2, Armitage J3, Chinoy H4, Cooper RG5, Laaksonen R6, Carr DF1, Bloch KM1, Fahy J1, Hanson A1, Yue QY7, Wadelius M8, Maitland-van Der Zee AH9, Voora D10, Psaty BM11, Palmer CN12, Pirmohamed M1: Phenotype standardization for statin-induced myotoxicity. *Clin Pharmacol Ther*. 2014 Oct;96(4):470-6. doi: 10.1038/clpt.2014.121. Epub 2014 Jun 4.

ASCVD Risk Estimator Plus. ACC. <http://tools.acc.org/ascvd-risk-estimator/> (utolsó letöltés: 2018.01.23.)

Banach M1, Serban C2, Sahebkar A3, Ursoniu S4, Rysz J5, Muntner P6, Toth PP7, Jones SR8, Rizzo M9, Glasser SP10, Lip GY11, Dragan S12, Mikhailidis DP13; Lipid and Blood Pressure Meta-analysis Collaboration Group.: Effects of coenzyme Q10 on statin-induced myopathy: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Mayo Clin Proc*. 2015 Jan;90(1):24-34. doi: 10.1016/j.mayocp.2014.08.021. Epub 2014 Nov 14.

Bangham AD, Horne RW, Glauert AM, Dingle JT, Lucy JA.: Action of saponin on biological cell membranes. *Nature*. 1962 Dec 8;196:952-5.

Barrientos G, Sánchez-Aguilera P, Jaimovich E, Hidalgo C, Llanos P.: Membrane Cholesterol in Skeletal Muscle: A Novel Player in Excitation-Contraction Coupling and Insulin Resistance. *J Diabetes Res*. 2017;2017:3941898. doi: 10.1155/2017/3941898. Epub 2017 Mar 6.

Bellinger FP1, Raman AV, Reeves MA, Berry MJ.: Regulation and function of selenoproteins in human disease. *Biochem J*. 2009 Jul 29;422(1):11-22. doi: 10.1042/BJ20090219.

Berridge MJ, Bootman MD, Lipp P.: Calcium--a life and death signal. *Nature*. 1998 Oct 15;395(6703):645-8.

Block BA1, Imagawa T, Campbell KP, Franzini-Armstrong C.: Structural evidence for direct interaction between the molecular components of the transverse tubule/sarcoplasmic reticulum junction in skeletal muscle. *J Cell Biol*. 1988 Dec;107(6 Pt 2):2587-600.

Bruckert E1, Hayem G, Dejager S, Yau C, Bégaud B.: Mild to moderate muscular symptoms with high-dosage statin therapy in hyperlipidemic patients--the PRIMO study. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2005 Dec;19(6):403-14.

Buckingham M1, Bajard L, Chang T, Daubas P, Hadchouel J, Meilhac S, Montarras D, Rocancourt D, Relaix F.: The formation of skeletal muscle: from somite to limb. *J Anat.* 2003 Jan;202(1):59-68.

Buettner C1, Lecker SH.: Molecular basis for statin-induced muscle toxicity: implications and possibilities. *Pharmacogenomics.* 2008 Aug;9(8):1133-42. doi: 10.2217/14622416.9.8.1133.

Caso G1, Kelly P, McNurlan MA, Lawson WE.: Effect of coenzyme q10 on myopathic symptoms in patients treated with statins. *Am J Cardiol.* 2007 May 15;99(10):1409-12. Epub 2007 Apr 3.

Celichowski J1, Grottel K: Twitch/tetanus ratio and its relation to other properties of motor units. *Neuroreport.* 1993 Dec 13;5(3):201-4.

Cheng H1, Lederer WJ, Cannell MB.: Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle. *Science.* 1993 Oct 29;262(5134):740-4.

Cheng H1, Song LS, Shirokova N, González A, Lakatta EG, Ríos E, Stern MD.: Amplitude distribution of calcium sparks in confocal images: theory and studies with an automatic detection method. *Biophys J.* 1999 Feb;76(2):606-17.

Chodick G1, Shalev V, Gerber Y, Heymann AD, Silber H, Simah V, Kokia E.: Long-term persistence with statin treatment in a not-for-profit health maintenance organization: a population-based retrospective cohort study in Israel. *Clin Ther.* 2008 Nov;30(11):2167-79. doi: 10.1016/j.clinthera.2008.11.012.

Cseri J1, Szappanos H, Szigeti GP, Csernátóny Z, Kovács L, Csernoch L.: A purinergic signal transduction pathway in mammalian skeletal muscle cells in culture. *Pflugers Arch.* 2002 Mar;443(5-6):731-8. Epub 2001 Dec 4.

Csernoch L1.: Regulation of the ryanodine receptor calcium release channel of the sarcoplasmic reticulum in skeletal muscle. *Acta Physiol Hung.* 1999;86(2):77-97.

Csernoch, L., Zhou, J., Launikonis, B., Adom, G., Stern, M., Brum, G., Ríos, E.: The effects of SO₄²⁻, a Ca²⁺-precipitating buffer, on Ca²⁺ sparks of mammalian and batrachian twitch muscle. *Biophys. J* 84 386a., 2003.

Csernoch L1.: Sparks and embers of skeletal muscle: the exciting events of contractile activation. *Pflugers Arch.* 2007 Sep;454(6):869-78. Epub 2007 Mar 7.

Damjanovich S, Fidy J, Szöllösi J.: Orvosi biofizika (2007) Medicina Könyvkiadó Zrt. http://www.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop425/2011_0001_524_Biofizika/ch05.html (utolsó letöltés: 2018.01.23.)

Darras BT: Energy metabolism in muscle. UpToDate, 2017.11.19. https://www.uptodate.com/contents/energy-metabolism-in-muscle?search=Energy%20metabolism%20in%20muscle&source=search_result&selectedTitle=1~150&usage_type=default&display_rank=1 (utolsó letöltés: 2018.01.23.)

DeSesso JM, Jacobson CF.: Anatomical and physiological parameters affecting gastrointestinal absorption in humans and rats. *Food Chem Toxicol.* 2001 Mar;39(3):209-28.

Diem K, Lenter C.: *Scientific Tables* (Seventh edition, 1971) **565**. Basel: Ciba-Geigy Limited. pp. 653–654. [ISBN 978-3-9801244-0-9](#).

Dirks AJ1, Jones KM.: Statin-induced apoptosis and skeletal myopathy. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2006 Dec;291(6):C1208-12. Epub 2006 Aug 2.

Draeger A1, Monastyrskaya K, Mohaupt M, Hoppeler H, Savolainen H, Allemann C, Babiychuk EB.: Statin therapy induces ultrastructural damage in skeletal muscle in patients without myalgia. *J Pathol.* 2006 Sep;210(1):94-102.

Draeger A1, Sanchez-Freire V, Monastyrskaya K, Hoppeler H, Mueller M, Breil F, Mohaupt MG, Babiychuk EB.: Statin therapy and the expression of genes that regulate calcium homeostasis and membrane repair in skeletal muscle. *Am J Pathol.* 2010 Jul;177(1):291-9. doi: 10.2353/ajpath.2010.091140. Epub 2010 May 20.

Dreier JP1, Endres M.: Statin-associated rhabdomyolysis triggered by grapefruit consumption. *Neurology.* 2004 Feb 24;62(4):670.

Endo M.: Calcium release from the sarcoplasmic reticulum. *Physiol Rev.* 1977 Jan;57(1):71-108.

Endo A.: The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors. *J Lipid Res.* 1992 Nov;33(11):1569-82.

Endo A.: [The origin of the statins](#). International Congress Series. 2004;1262: 3–8. doi:10.1016/j.ics.2003.12.099.

Faqui A S.: *A Comprehensive Guide to Toxicology in Nonclinical Drug Development*. 2013 Elsevier Inc. ISBN: 978-0-12-387815-1.

Flint OP1, Masters BA, Gregg RE, Durham SK.: HMG CoA reductase inhibitor-induced myotoxicity: pravastatin and lovastatin inhibit the geranylgeranylation of low-molecular-weight proteins in neonatal rat muscle cell culture. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1997 Jul;145(1):99-110.

Fridewald WF, Levy RI, Frederickson DS.: Estimation of LDLcholesterol concentration without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem.* 1972; 18:499–502

Furberg CD1, Pitt B.: Withdrawal of cerivastatin from the world market. *Curr Control Trials Cardiovasc Med.* 2001;2(5):205-207.

Ghada AS1.: Dietary Cholesterol and the Lack of Evidence in Cardiovascular Disease. *Nutrients.* 2018 Jun 16;10(6):780. doi: 10.3390/nu10060780.

Ghirlanda G1, Oradei A, Manto A, Lippa S, Uccioli L, Caputo S, Greco AV, Littarru GP.: Evidence of plasma CoQ10-lowering effect by HMG-CoA reductase inhibitors: a double-blind, placebo-controlled study. *J Clin Pharmacol.* 1993 Mar;33(3):226-9.

Giknis MLA, Clifford CB.: Clinical Laboratory Parameters for CrI:WI(HAN). Charles River Laboratories, March 2008.

<https://www.criver.com/resources/rmrmrwistarhancinlabparameters08> (utolsó letöltés: 2018.01.23.)

Goedeke L1, Fernández-Hernando C.: Regulation of cholesterol homeostasis. *Cell Mol Life Sci.* 2012 Mar;69(6):915-30. doi: 10.1007/s00018-011-0857-5. Epub 2011 Oct 19.

Goodman CA1, Pol D2, Zacharewicz E3, Lee-Young RS4, Snow RJ3, Russell AP3, McConell GK1.: Statin-Induced Increases in Atrophy Gene Expression Occur Independently of Changes in PGC1 α Protein and Mitochondrial Content. *PLoS One.* 2015 May 28;10(5):e0128398. doi: 10.1371/journal.pone.0128398. eCollection 2015.

Gryniewicz G, Poenie M, Tsien RY.: A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem.* 1985 Mar 25;260(6):3440-50.

Haines TH1.: Do sterols reduce proton and sodium leaks through lipid bilayers? *Prog Lipid Res.* 2001 Jul;40(4):299-324.

Harangi M., Zsíros N, Juhász L, Paragh Gy.: Statin okozta mellékhatások – tények és gének. *Orv. Hetil.,* 2013, 154, 83–92.

Harper CR1, Jacobson TA.: The broad spectrum of statin myopathy: from myalgia to rhabdomyolysis. *Curr Opin Lipidol.* 2007 Aug;18(4):401-8.

History of the Framingham Heart Study. Framingham Heart Study, 2018. 01. 23. <https://www.framinghamheartstudy.org/about-fhs/history.php> (utolsó letöltés: 2018.01.23.)

Huerta-Alardín AL, Varon J, Marik PE.: Bench-to-bedside review: Rhabdomyolysis -- an overview for clinicians. *Crit Care.* 2005 Apr;9(2):158-69. Epub 2004 Oct 20.

Hungary: WHO statistical profile. Country statistics and global health estimates by WHO and UN partners, January 2015. <http://www.who.int/gho/countries/hun.pdf?ua=1> (utolsó letöltés: 2018.01.23.)

Ikonen E1.: Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008 Feb;9(2):125-38. doi: 10.1038/nrm2336.

Incardona JP1, Eaton S.: Cholesterol in signal transduction. *Curr Opin Cell Biol.* 2000 Apr;12(2):193-203. doi: 10.1016/s0955-0674(99)00076-9.

Isaeva EV1, Shkryl VM, Shirokova N.: Mitochondrial redox state and Ca²⁺ sparks in permeabilized mammalian skeletal muscle. *J Physiol.* 2005 Jun 15;565(Pt 3):855-72. Epub 2005 Apr 21.

Istvan, ES.; Deisenhofer, J.: Structural Mechanism for Statin Inhibition of HMG-CoA Reductase. *Science Magazine* 2001 May;292 (5519): 1160–4. doi:10.1126/science.1059344. PMID 11349148.

Jóna II, Szegedi C, Sárközi S, Szentesi P, Csernoch L, Kovács L.: Altered inhibition of the rat skeletal ryanodine receptor/calcium release channel by magnesium in the presence of ATP. *Pflugers Arch.* 2001 Mar;441(6):729-38.

Jones PM1, George AM.: The ABC transporter structure and mechanism: perspectives on recent research. Ref: Cell Mol Life Sci. 2004 Mar;61(6):682-99.

Kirsch WG1, Uttenweiler D, Fink RH.: Spark- and ember-like elementary Ca²⁺ release events in skinned fibres of adult mammalian skeletal muscle. J Physiol. 2001 Dec 1;537(Pt 2):379-89.

Kaufmann P1, Török M, Zahno A, Waldhauser KM, Brecht K, Krähenbühl S.: Toxicity of statins on rat skeletal muscle mitochondria. Cell Mol Life Sci. 2006 Oct;63(19-20):2415-25.

Klein MG1, Cheng H, Santana LF, Jiang YH, Lederer WJ, Schneider MF.: Two mechanisms of quantized calcium release in skeletal muscle. Nature. 1996 Feb 1;379(6564):455-8.

Klein MG1, Schneider MF.: Ca²⁺ sparks in skeletal muscle. Prog Biophys Mol Biol. 2006 Nov;92(3):308-32. Epub 2005 Jul 1.

Knoblauch M1, Dagnino-Acosta A, Hamilton SL.: Mice with RyR1 mutation (Y524S) undergo hypermetabolic response to simvastatin. Skelet Muscle. 2013 Sep 3;3(1):22. doi: 10.1186/2044-5040-3-22.

Kohro T, Yamazaki T.: Mechanism of statin-induced myopathy investigated using microarray technology. J Atheroscler Thromb. 2009 Mar;16(1):30-2. Epub 2009 Mar 5.

Kon M1, Kimura F, Akimoto T, Tanabe K, Murase Y, Ikemune S, Kono I.: Effect of Coenzyme Q10 supplementation on exercise-induced muscular injury of rats. Exerc Immunol Rev. 2007;13:76-88.

Krause BR1, Newton RS.: Lipid-lowering activity of atorvastatin and lovastatin in rodent species: triglyceride-lowering in rats correlates with efficacy in LDL animal models. Atherosclerosis. 1995 Oct;117(2):237-44.

Labeit S1, Barlow DP, Gautel M, Gibson T, Holt J, Hsieh CL, Francke U, Leonard K, Wardale J, Whiting A, és mtsai.: A regular pattern of two types of 100-residue motif in the sequence of titin. Nature. 1990 May 17;345(6272):273-6.

Lee MK1, Park YB, Moon SS, Bok SH, Kim DJ, Ha TY, Jeong TS, Jeong KS, Choi MS.: Hypocholesterolemic and antioxidant properties of 3-(4-hydroxyl)propanoic acid derivatives in high-cholesterol fed rats. Chem Biol Interact. 2007 Oct 20;170(1):9-19. Epub 2007 Jun 24.

Legrand C1, Giacomello E, Berthier C, Allard B, Sorrentino V, Jacquemond V.: Spontaneous and voltage-activated Ca²⁺ release in adult mouse skeletal muscle fibres expressing the type 3 ryanodine receptor. J Physiol. 2008 Jan 15;586(2):441-57. Epub 2007 Nov 15.

Lescol. RxList, February 2012. <http://www.rxlist.com/lescol-drug.htm> (utolsó letöltés: 2018.01.23.)

Littlefield N1, Beckstrand RL, Luthy KE.: Statins' effect on plasma levels of Coenzyme Q10 and improvement in myopathy with supplementation. J Am Assoc Nurse Pract. 2014 Feb;26(2):85-90. doi: 10.1002/2327-6924.12046. Epub 2013 Jul 12.

Lotteau S, MacDougall D, Steele D, Calaghan S.: Statin Induced Myopathy: A Role for Mitochondrial Ca²⁺ and No in Enhanced Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺ Leak. *Biophys J*. 2015 Jan 27; 108(2)Suppl:567a

Löhn M1, Fürstenau M, Sagach V, Elger M, Schulze W, Luft FC, Haller H, Gollasch M.: Ignition of calcium sparks in arterial and cardiac muscle through caveolae. *Circ Res*. 2000 Nov 24;87(11):1034-9.

Lu LS1, Hung LM, Liao CH, Wu CC, Su MJ.: Effects of rosiglitazone on native low-density-lipoprotein-induced respiratory burst in circulating monocytes and on the leukocyte-endothelial interaction in cholesterol-fed rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2007 Jun;375(4):251-60. Epub 2007 Apr 21.

Lytton J1, Westlin M, Burk SE, Shull GE, MacLennan DH.: Functional comparisons between isoforms of the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum family of calcium pumps. *J Biol Chem*. 1992 Jul 15;267(20):14483-9.

Mancini GB1, Baker S, Bergeron J, Fitchett D, Frohlich J, Genest J, Gupta M, Hegele RA, Ng D, Pope J.: Diagnosis, prevention, and management of statin adverse effects and intolerance: proceedings of a Canadian Working Group Consensus Conference. *Can J Cardiol*. 2011 Sep-Oct;27(5):635-62. doi: 10.1016/j.cjca.2011.05.007.

Mancini GB1, Baker S2, Bergeron J3, Fitchett D4, Frohlich J5, Genest J6, Gupta M2, Hegele RA7, Ng D4, Pearson GJ8, Pope J7, Tashakkor AY5.: Diagnosis, Prevention, and Management of Statin Adverse Effects and Intolerance: Canadian Consensus Working Group Update (2016). *Can J Cardiol*. 2016 Jul;32(7 Suppl):S35-65. doi: 10.1016/j.cjca.2016.01.003. Epub 2016 Jan 14.

Marshall, W. J. (1995). *Clinical Chemistry* (3rd ed.). London: Mosby. [ISBN 0-7234-2190-0](#).

Mauro A.: Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol*. 1961 Feb;9:493-5.

Meissner G, Darling E, Eveleth J.: Kinetics of rapid Ca²⁺ release by sarcoplasmic reticulum. Effects of Ca²⁺, Mg²⁺, and adenine nucleotides. *Biochemistry*. 1986 Jan 14;25(1):236-44.

Mochizuki H1, Takido J, Yokogoshi H.: Improved suppression by dietary taurine of the fecal excretion of bile acids from hypothyroid rats. *Biosci Biotechnol Biochem*. 1999 Apr;63(4):753-5.

Mohaupt MG1, Karas RH, Babiychuk EB, Sanchez-Freire V, Monastyrskaya K, Iyer L, Hoppeler H, Breil F, Draeger A.: Association between statin-associated myopathy and skeletal muscle damage. *CMAJ*. 2009 Jul 7;181(1-2):E11-8. doi: 10.1503/cmaj.081785.

Moßhammer D1, Schaeffeler E, Schwab M, Mörike K.: Mechanisms and assessment of statin-related muscular adverse effects. *Br J Clin Pharmacol*. 2014 Sep;78(3):454-66. doi: 10.1111/bcp.12360.

Naci H1, Bruggs J, Ades T.: Comparative tolerability and harms of individual statins: a study-level network meta-analysis of 246 955 participants from 135 randomized, controlled trials. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes*. 2013 Jul;6(4):390-9.

Nelson MR1, Thulin E, Fagan PA, Forsén S, Chazin WJ.: The EF-hand domain: a globally cooperative structural unit. *Protein Sci.* 2002 Feb;11(2):198-205.

Oddoux S1, Brocard J, Schweitzer A, Szentesi P, Giannesini B, Brocard J, Fauré J, Pernet-Gallay K, Bendahan D, Lunardi J, Csernoch L, Marty I.: Triadin deletion induces impaired skeletal muscle function. *J Biol Chem.* 2009 Dec 11;284(50):34918-29. doi: 10.1074/jbc.M109.022442. Epub 2009 Oct 19.

Paragh G1, Fóris G, Paragh G Jr, Seres I, Karányi Z, Fülöp P, Balogh Z, Kosztáczky B, Teichmann F, Kertai P.: Different anticancer effects of fluvastatin on primary hepatocellular tumors and metastases in rats. *Cancer Lett.* 2005 May 10;222(1):17-22.

Payne AH1, Hales DB.: Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endocr Rev.* 2004 Dec;25(6):947-70. doi: 10.1210/er.2003-0030.

Pfuntner A, Wier LM, Steiner C.: Costs for Hospital Stays in the United States, 2011: Statistical Brief #168. Healthcare Cost and Utilization Project (HCUP), December 2013. Agency for Healthcare Research and Quality, Rockville, MD. www.hcup-us.ahrq.gov/reports/statbriefs/sb168-Hospital-Costs-United-States-2011.jsp (utolsó letöltés: 2018.01.23.)

Piepoli MF, Hoes AW, Agewall S1, Albus C2, Brotons C3, Catapano AL4, Cooney MT1, Corrà U1, Cosyns B1, Deaton C1, Graham I1, Hall MS5, Hobbs FD3, Løchen ML1, Löllgen H6, Marques-Vidal P1, Perk J1, Prescott E1, Redon J7, Richter DJ1, Sattar N8, Smulders Y1, Tiberi M1, Bart van der Worp H9, van Dis I10, Verschuren WM1.: 2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: The Sixth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of 10 societies and by invited experts) Developed with the special contribution of the European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR). *Atherosclerosis.* 2016 Sep;252:207-74. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2016.05.037.

Portilho DM1, Soares CP, Morrot A, Thiago LS, Butler-Browne G, Savino W, Costa ML, Mermelstein C.: Cholesterol depletion by methyl- β -cyclodextrin enhances cell proliferation and increases the number of desmin-positive cells in myoblast cultures. *Eur J Pharmacol.* 2012 Nov 5;694(1-3):1-12. doi: 10.1016/j.ejphar.2012.07.035. Epub 2012 Aug 19.

Pouvreau S1, Royer L, Yi J, Brum G, Meissner G, Ríos E, Zhou J.: Ca(2+) sparks operated by membrane depolarization require isoform 3 ryanodine receptor channels in skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Mar 20;104(12):5235-40. Epub 2007 Mar 14.

Qu-Petersen Z1, Deasy B, Jankowski R, Ikezawa M, Cummins J, Pruchnic R, Mytinger J, Cao B, Gates C, Wernig A, Huard J.: Identification of a novel population of muscle stem cells in mice: potential for muscle regeneration. *J Cell Biol.* 2002 May 27;157(5):851-64. Epub 2002 May 20.

Ranatunga KW.: Temperature-dependence of shortening velocity and rate of isometric tension development in rat skeletal muscle. *J Physiol.* 1982 Aug;329:465-83.

Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S) *Lancet*. 1994 Nov 19;344(8934):1383-9.[No authors listed]

Ríos E1, Stern MD.: Calcium in close quarters: microdomain feedback in excitation-contraction coupling and other cell biological phenomena. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 1997;26:47-82.

Ross R1.: The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*. 1993 Apr 29;362(6423):801-9.

Ross R1.: Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999 Jan 14;340(2):115-26.

Rosenson RS1, Baker SK2, Jacobson TA3, Kopecky SL4, Parker BA5, The National Lipid Association's Muscle Safety Expert Panel.: An assessment by the Statin Muscle Safety Task Force: 2014 update. *J Clin Lipidol*. 2014 May-Jun;8(3 Suppl):S58-71. doi: 10.1016/j.jacl.2014.03.004.

Sacher J1, Weigl L, Werner M, Szegedi C, Hohenegger M.: Delineation of myotoxicity induced by 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase inhibitors in human skeletal muscle cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005 Sep;314(3):1032-41. Epub 2005 May 24.

Santillo M1, Migliaro A, Mondola P, Laezza C, Damiano S, Stingo S, Fiorentino L, Andreozzi A, Vitale M, Bifulco M.: Dietary and hypothyroid hypercholesterolemia induces hepatic apolipoprotein E expression in the rat: direct role of cholesterol. *FEBS Lett*. 1999 Dec 10;463(1-2):83-6.

Saxon DR1, Eckel RH2: Statin Intolerance: A Literature Review and Management Strategies. *Prog Cardiovasc Dis*. 2016 Sep - Oct;59(2):153-164. doi: 10.1016/j.pcad.2016.07.009. Epub 2016 Aug 3.

Seale P1, Sabourin LA, Girgis-Gabardo A, Mansouri A, Gruss P, Rudnicki MA.: Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell*. 2000 Sep 15;102(6):777-86.

Sebille S1, Cantereau A, Vandebrouck C, Balghi H, Constantin B, Raymond G, Cognard C.: Calcium sparks in muscle cells: interactive procedures for automatic detection and measurements on line-scan confocal images series. *Comput Methods Programs Biomed*. 2005 Jan;77(1):57-70.

Shirokova N1, García J, Ríos E.: Local calcium release in mammalian skeletal muscle. *J Physiol*. 1998 Oct 15;512 (Pt 2):377-84.

Simons, J: The \$10 Billion Pill Hold the fries, please. Lipitor, the cholesterol-lowering drug, has become the bestselling pharmaceutical in history. Here's how Pfizer did it. *Fortune Magazine*, January 20, 2003.
http://archive.fortune.com/magazines/fortune/fortune_archive/2003/01/20/335643/index.htm
(utolsó letöltés: 2018.01.23.)

Sirvent P1, Mercier J, Vassort G, Lacampagne A.: Simvastatin triggers mitochondria-induced Ca²⁺ signaling alteration in skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 Apr 15;329(3):1067-75.

Sirvent P1, Mercier J, Lacampagne A.: New insights into mechanisms of statin-associated myotoxicity. *Curr Opin Pharmacol*. 2008 Jun;8(3):333-8. doi: 10.1016/j.coph.2007.12.010. Epub 2008 Feb 1.

Sirvent P1, Fabre O, Bordenave S, Hillaire-Buys D, Raynaud De Mauverger E, Lacampagne A, Mercier J.: Muscle mitochondrial metabolism and calcium signaling impairment in patients treated with statins. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2012 Mar 1;259(2):263-8. doi: 10.1016/j.taap.2012.01.008. Epub 2012 Jan 17.

Skarlovnik A1, Janić M1, Lunder M1, Turk M1, Šabovič M1.: Coenzyme Q10 supplementation decreases statin-related mild-to-moderate muscle symptoms: a randomized clinical study. *Med Sci Monit*. 2014 Nov 6;20:2183-8. doi: 10.12659/MSM.890777.

Somodi S1, Balajthy A, Szilágyi O, Pethő Z, Harangi M, Paragh G, Panyi G, Hajdu P. Analysis of the K⁺ current in human CD4⁺ T lymphocytes in hypercholesterolemic state *Cell Immunol*. 2013 Jan;281(1):20-6. doi: 10.1016/j.cellimm.2013.01.004. Epub 2013 Jan 29.

Stages of endothelial dysfunction in atherosclerosis. "Endo dysfunction Athero" Licensed under [GNU Free Documentation License](#), CC BY-SA 3.0 via Wikimedia Commons. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Endo_dysfunction_Athero.PNG#/media/File:Endo_dysfunction_Athero.PNG (utolsó letöltés: 2018.01.23.)

Stone NJ, Robinson JG, Lichtenstein AH, Bairey Merz CN, Blum CB, Eckel RH, Goldberg AC, Gordon D, Levy D, Lloyd-Jones DM, McBride P, Schwartz JS, Shero ST, Smith SC Jr, Watson K, Wilson PW; American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines.: 2013 ACC/AHA guideline on the treatment of blood cholesterol to reduce atherosclerotic cardiovascular risk in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol*. 2014 Jul 1;63(25 Pt B):2889-934. doi: 10.1016/j.jacc.2013.11.002. Epub 2013 Nov 12.

Strand MA1, Louis CF, Mickelson JR.: Phosphorylation of the porcine skeletal and cardiac muscle sarcoplasmic reticulum ryanodine receptor. *Biochim Biophys Acta*. 1993 Feb 17;1175(3):319-26.

Stroes ES1, Thompson PD2, Corsini A3, Vladutiu GD4, Raal FJ5, Ray KK6, Roden M7, Stein E8, Tokgozoğlu L9, Nordestgaard BG10, Bruckert E11, De Backer G12, Krauss RM13, Laufs U14, Santos RD15, Hegele RA16, Hovingh GK17, Leiter LA18, Mach F19, März W20, Newman CB21, Wiklund O22, Jacobson TA23, Catapano AL3, Chapman MJ24, Ginsberg HN; European Atherosclerosis Society Consensus Panel.: Statin-associated muscle symptoms: impact on statin therapy-European Atherosclerosis Society Consensus Panel Statement on Assessment, Aetiology and Management. *Eur Heart J*. 2015 May 1;36(17):1012-22. doi: 10.1093/eurheartj/ehv043. Epub 2015 Feb 18.

Stossel TP1.: The discovery of statins. *Cell*. 2008 Sep 19;134(6):903-5. doi: 10.1016/j.cell.2008.09.008.

Suckow MA, Weisbroth SH, Franklin CL.: *The Laboratory Rat*. Elsevier Inc., San Diego. 2006; ISBN: 978-0-12-074903-4

Szabó LZ1, Vincze J, Csernoch L, Szentesi P.: Improved spark and ember detection using stationary wavelet transforms. *J Theor Biol.* 2010 Jun 21;264(4):1279-92. doi: 10.1016/j.jtbi.2010.04.005. Epub 2010 Apr 9.

Szappanos H1, Cseri J, Deli T, Kovács L, Csernoch L.: Determination of depolarisation- and agonist-evoked calcium fluxes on skeletal muscle cells in primary culture. *J Biochem Biophys Methods.* 2004 Apr 30;59(1):89-101.

Szentesi P1, Csernoch L1, Dux L2, Keller-Pintér A2: Changes in Redox Signaling in the Skeletal Muscle with Aging. *Review Oxid Med Cell Longev.* 2019 Jan 17;2019:4617801. doi: 10.1155/2019/4617801. eCollection 2019.

Szentesi P1, Szappanos H, Szegedi C, Gönczi M, Jona I, Cseri J, Kovács L, Csernoch L.: Altered elementary calcium release events and enhanced calcium release by thymol in rat skeletal muscle. *Biophys J.* 2004 Mar;86(3):1436-53.

Taylor BA1, Lorson L2, White CM3, Thompson PD3.: A randomized trial of coenzyme Q10 in patients with confirmed statin myopathy. *Atherosclerosis.* 2015 Feb;238(2):329-35. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2014.12.016. Epub 2014 Dec 17.

Taylor F1, Huffman MD, Macedo AF, Moore TH, Burke M, Davey Smith G, Ward K, Ebrahim S.: Statins for the primary prevention of cardiovascular disease. *Cochrane Database Syst Rev.* 2013 Jan 31;(1):CD004816. doi: 10.1002/14651858.CD004816.pub5.

The top 10 causes of death. WHO Fact sheet, 2017. január. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/> (utolsó letöltés: 2018.01.23.)

Thomas L.: Labor und diagnose, 4th edn. Die Medizinische Verlagsgesellschaft, Marburg (1992)

Tobert, JA.: Lovastatin and beyond: The history of the HMG-CoA reductase inhibitors. *Nature Reviews Drug Discovery.* 2003 July; 2 (7): 517–526. doi:10.1038/nrd1112. PMID 12815379.

Tsugorka A1, Ríos E, Blatter LA.: Imaging elementary events of calcium release in skeletal muscle cells. *Science.* 1995 Sep 22;269(5231):1723-6.

Xu L1, Tripathy A, Pasek DA, Meissner G.: Potential for pharmacology of ryanodine receptor/calcium release channels. *Ann N Y Acad Sci.* 1998 Sep 16;853:130-48. doi: 10.1111/j.1749-6632.1998.tb08262.x.

Yeagle PL1.: Modulation of membrane function by cholesterol. *Biochimie.* 1991 Oct;73(10):1303-10. doi: 10.1016/0300-9084(91)90093-g.

Yerroum M1, Braconnier F, Chariot P.: Influence of handling procedures on rat plasma creatine kinase activity. *Muscle Nerve.* 1999 Aug;22(8):1119-21.

Yin CC1, D'Cruz LG, Lai FA.: Ryanodine receptor arrays: not just a pretty pattern? *Trends Cell Biol.* 2008 Apr;18(4):149-56. doi: 10.1016/j.tcb.2008.02.003.

Young JM1, Florkowski CM, Molyneux SL, McEwan RG, Frampton CM, George PM, Scott RS.: Effect of coenzyme Q(10) supplementation on simvastatin-induced myalgia. *Am J Cardiol.* 2007 Nov 1;100(9):1400-3. Epub 2007 Aug 16.

Vites AM1, Pappano AJ.: Distinct modes of inhibition by ruthenium red and ryanodine of calcium-induced calcium release in avian atrium. *J Pharmacol Exp Ther.* 1994 Mar;268(3):1476-84.

Wang CY1, Liu PY, Liao JK.: Pleiotropic effects of statin therapy: molecular mechanisms and clinical results. *Trends Mol Med.* 2008 Jan;14(1):37-44.

Westwood FR1, Bigley A, Randall K, Marsden AM, Scott RC.: Statin-induced muscle necrosis in the rat: distribution, development, and fibre selectivity. *Toxicol Pathol.* 2005;33(2):246-57.

Zarka A1, Shoshan-Barmatz V.: Characterization and photoaffinity labeling of the ATP binding site of the ryanodine receptor from skeletal muscle. *Eur J Biochem.* 1993 Apr 1;213(1):147-54.

Zhou J1, Brum G, Gonzalez A, Launikonis BS, Stern MD, Rios E.: Ca²⁺ sparks and embers of mammalian muscle. Properties of the sources. *J Gen Physiol.* 2003 Jul;122(1):95-114.

Zhou J1, Yi J, Royer L, Launikonis BS, González A, García J, Ríos E.: A probable role of dihydropyridine receptors in repression of Ca²⁺ sparks demonstrated in cultured mammalian muscle. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2006 Feb;290(2):C539-53. Epub 2005 Sep 7.

Zucchi R1, Ronca-Testoni S.: The sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ channel/ryanodine receptor: modulation by endogenous effectors, drugs and disease states. *Pharmacol Rev.* 1997 Mar;49(1):1-51.



Nyilvántartási szám: DEENK/518/2021.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Füzi Márta
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Vincze, J., Jenes, Á., **Füzi, M.**, Almássy, J., Németh, R., Szigeti, G., Dienes, B., Gaál, Z., Szentesi, P., Jóna, I., Kertai, P., Paragh, G., Csernoch, L.: Effects of fluvastatin and coenzyme Q10 on skeletal muscle in normo- and hypercholesterolaemic rats.
J. Muscle Res. Cell Motil. 36 (3), 263-274, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10974-015-9413-5>
IF: 2.071
2. **Füzi, M.**, Palicz, Z., Vincze, J., Cseri, J., Szombathy, Z., Kovács, I., Oláh, A., Szentesi, P., Kertai, P., Paragh, G., Csernoch, L.: Fluvastatin-induced alterations of skeletal muscle function in hypercholesterolaemic rats.
J. Muscle Res. Cell Motil. 32 (6), 391-401, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10974-011-9272-7>
IF: 1.358

További közlemények

3. Lőrincz, I., Szánthó, E., Simkó, J., Szabó, Z., Barta, K., **Füzi, M.**, Szigeti, G.: A fokozott arrhythmiarizikó új markere: a mikrovolt T-hullám-alternáns patomechanizmusa és vizsgálati módszerei.
Orv. Hetil. 151 (30), 1215-1224, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/OH.2010.28926>
4. Hargitai, D., Pataki, Á., Raffai, G., **Füzi, M.**, Danko, T., Csernoch, L., Várnai, P., Szigeti, G., Zsembery, Á.: Calcium entry is regulated by Zn²⁺ in relation to extracellular ionic environment in human airway epithelial cells.
Respir. Physiol. Neurobiol. 170 (1), 67-75, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.resp.2009.12.001>
IF: 2.382





5. Lőrincz, I., Szabó, Z., Simkó, J., Szánthó, E., Barta, K., **Füzi, M.**, Szigeti, G.: A pitvarfibrilláció és a vegetatív idegrendszer.

Orv. Hetil. 149 (43), 2019-2028, 2008.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/OH.2008.28466>

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 5,811

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
3,429**

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

Debrecen, 2021.12.03.



Tárgyszavak

hiperkoleszterinemia, vázizom, kalcium homeosztázis, izomerő, patkány, fluvastatin, sejtenyészet

hypercholesterolaemia, skeletal muscle, calcium homeostasis, muscle force, rat, fluvastatin, cell culture

Ábrajegyzék

1. ábra. A myogenezis.
2. ábra. A vékony és a vastag filamentumok szerkezete, kapcsolata.
3. ábra. Az elektromechanikai kapcsolat működése vázizomban.
4. ábra. A vázizomrostok Ca^{2+} felszabadító egysége (CRU).
5. ábra: Kalcium sparkok emlős vázizomroston
6. ábra. Elemi kalcium-felszabadulási események fajtái.
7. ábra. A WHO magyarországi statisztikája: mortalitás és betegség-teher.
8. ábra. Az atherosclerosis kialakulásának folyamata és szövődményei.
9. ábra. A koleszterin szintézise.
10. ábra: Az 1. és 2. típusú statinok szerkezete.
11. ábra. A: A fluvastatin molekulaképlete. B: A HMG-CoA reduktáz enzim és a fluvastatin kapcsolatának térbeli modellje.
12. ábra. Koenzim Q10 szerkezeti képlete.
13. ábra: Primer vázizom sejt kultúra fényképe.
14. ábra: A kontrakciós erő méréséhez használt elrendezés.
15. ábra: Fluoreszcens festékkel feltöltött izolált vázizomrost konfokális mikroszkópos képe.
16. ábra: A PTI kettős monokromátor működése és a Fura2-AM kalcium-indikátorral történő mérés sematikus ábrája.
17. ábra: A konfokális lézermikroszkóp és az elemi események detektálásának sematikus ábrája.
18. ábra: A vonal menti leképzés sematikus ábrája.
19. ábra: A kalcium-spark morfológiája.
20. ábra: K, S tenyészetek reprezentatív képei a tenyésztési idő függvényében.
21. ábra. A fluvastatin hatása a vázizomsejtek proliferációjára és differenciálódására.
22. ábra. A máj fénymikroszkópos képe a különböző kezelési csoportokban.
23. ábra. Az EDL izom fénymikroszkópos képei a különböző kezelési csoportokban.

24. ábra. Nyugalmi kalcium-koncentráció
25. ábra. TU, HC és HC+S állatokból izolált izmokon mért erő tranziensek
26. ábra. Az izomösszehúzódások kinetikai paraméterei
27. ábra: Maximális izomerő
28. ábra. K és Q10 kezelt patkányok izolált vázizmain mért erő-tranziensek
29. ábra. HC és Q10 kezelt patkányok izolált vázizmain mért maximális erő átlagok
30. ábra: Spontán kalcium-felszabadulási események K és S kezelési csoportokban.
31. ábra: A kalcium-sparkok gyakorisága izolált vázizom rostokon.
32. ábra: Spontán kalcium-felszabadulási események HC és HC+S kezelési csoportokban.
33. ábra: Az egyedi kalcium-felszabadulási események paraméterei.
34. ábra: A kalcium-sparkok gyakorisága Q10 diéta mellett.
35. ábra. Koenzim Q10 kezelés hatása az elemi kalcium-felszabadulási eseményekre.
1. táblázat. Az izomrostok csoportosítása ATP-áz aktivitás és MHC alapján.
2. táblázat. Lipoproteinek
3. táblázat. Az általunk használt különböző diéták összetétele.
4. táblázat: anatómiai eredmények.
5. táblázat: Vércserumban mért lipid- és CK értékek.
6. táblázat: Keresztmetszetre normalizált izomerő
7. táblázat: Tetanusz-sorozattal kiváltott fáradás mértéke

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek: Prof. Dr. Csernoch Lászlónak, és Prof. Dr. Paragh Györgynek, amiért vállalták a témavezetésemet. Köszönöm a kísérletek tervezésében nyújtott szakmai segítséget; azt, hogy lehetővé tették munkám elvégzését, és külön köszönöm azt, ahogyan a kapott eredmények interpretálásában szakmailag irányítottak. Együtt segítettek mind az elméleti kísérletes munka, mind a klinikai relevanciáinak értékelése mellett a két terület összekapcsolásában; és köszönettel tartozom, amiért lehetőséget biztosítottak mind az elméleti, mind a gyakorlati készségeim és ismereteim fejlesztésére, valamint a szükséges eszközöket és anyagokat megteremtették a kísérletek elvégzéséhez.

Köszönettel tartozom közvetlen kollégáimnak a munkacsoportban: Dr. Szentesi Péternek, Dr. Dienes Beatrixnek, Dr. Jenes Ágnesnek és Dr. Vincze Jánosnak, akik rengeteget segítettek a helyes gyakorlat elsajátításában a kísérletek végrehajtásánál, az eredmények kiértékelésénél és a publikálás során. Köszönöm továbbá az egész munkacsoportnak, akikkel együtt dolgozhattam: Dr. Fodor Jánosnak, Dr. Gönczi Mónikának, Dr. Oláh Tamásnak, Dr. Palicz Zoltánnak, Dr. Ruzsnavszy Olgának és Dr. Sztretye Mónikának, hogy értékes tanácsaikkal és ötleteikkel segítettek a munkámat, és külön köszönöm a jó hangulatban eltöltött éveket.

Őszinte hálámat szeretném kifejezni Dr. Lőrincz Istvánnak és Dr. Szigeti Gyulának, amiért segítettek a munkámat elindítani.

Köszönöm Dr. V. Oláh Annának és Kalina Editnek a klinikai laboratóriumi vizsgálatokban nyújtott értékes segítségét. Köszönettel tartozom Dr. Kovács Ilona főorvosnőnek, és Dr. Szombathy Zitának a szövettani vizsgálatok során nyújtott pótolhatatlan segítségéért.

Hálával tartozom Óri Rózának, Dr. Varga Attilánének és Hadháziné Gyöngyinek a kísérletekben és azok előkészítésében; Orosz Józsefnek az állatokkal végzett munkában nyújtott segítségéért.

Ezúton szeretném külön köszönetemet kifejezni néhai Dr. Kertai Pál Professzor Úrnak a támogatásáért, a kiemelkedő szakmai segítségért, amit az állatmodell létrehozásában nyújtott, és köszönöm a lehetőséget, amit a kisállatokkal kapcsolatos operatív kísérletes technikák területén a manuális készségem fejlesztésében kaptam tőle.

Köszönetet mondok az Élettani Intézet minden munkatársának a támogatásért.

Végezetül szeretnék köszönetet mondani a családomnak és a jelenlegi kollégáimnak a biztatásért, a türelmükért, és hogy végig mellettem álltak.

A kutatások elvégzését a GINOP -2.3.2-15-2016-00005 számú projekt támogatta. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európa Regionális Fejlesztési Alap társfinanszírozásával valósult meg.

Függelék

A disszertációt megalapozó két közlemény különlenyomata.

1. **Fuzi M.**, Palicz Z., Vincze J., Cseri J., Szombathy Z., Kovacs I., Olah A., Szentesi P., Kertai P., Paragh G., Csernoch L. (2012) Fluvastatin-induced alterations of skeletal muscle function in hypercholesterolaemic rats. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 32(6): 391-401. **I.F.: 1,358**
2. Vincze J., Jenes Á., **Fuzi M.**, Almássy J., Németh R., Szigeti G., Dienes B., Szentesi P., Gaál Z., Jóna I., Kertai P., Paragh G., Csernoch L. (2015) Effects of fluvastatin and coenzyme Q10 on calcium sparks of skeletal muscle in normo- and hypercholesterolaemic rats. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 36(3): 263-274. **I.F.: 2,071**