

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**A fluvastatin hatása a patkány vázizom funkcióra –
hypercholesterinaemiás állatmodell használata**

Dr. Füzi Márta

Témavezetők: Dr. Csernoch László, Dr. Paragh György



DEBRECENI EGYETEM
Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2022.

A FLUVASTATIN HATÁSA A PATKÁNY VÁZIZOM FUNKCIÓRA - HYPERCHOLESTERINAEMIÁS ÁLLATMODELL HASZNÁLATA.

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

Írta: Dr. Fúzi Márta okleveles orvos

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

Témavezetők: Prof. Dr. Csernoch László, MTA doktora, Prof. Dr. Paragh György, MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Papp Zoltán, MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Vereb György, MTA doktora
Dr. Ivanics Tamás, PhD

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Élettani Intézet könyvtára
2017. 05. 22. 10:00.

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Tóth Attila, MTA doktora
Dr. Márk László, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Szöllősi János, akadémikus
tagok: Prof. Dr. Tóth Attila, MTA doktora
Dr. Márk László, PhD
Dr. Vámosi György, PhD
Dr. Ivanics Tamás, PhD

Az értekezés védésének időpontja: 2022. június 7. 10:00. A nyilvánosságot online módon biztosítjuk. Amennyiben a vitán részt kíván venni, jelezze a somogyi.gergo@med.unideb.hu e-mail címre küldött üzenetben 2022. június 6-án 13:00 óraig. A határidő lejártát követően technikai okok miatt már nincs lehetőség a védéshez kapcsolódni.

Bevezetés, előzmények

A hypercholesterinaemia és az érlemezés vezet a világ halálozási statisztikáját. 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. Myogenezis során az orsó alakú myoblastok fuzionálnak és több tucat sejtmaggal rendelkező izomrost (myotubulus) alakul ki, a myofibrillumok sarcomerákba rendeződése adja a harántcsíkolatot. Az idegsejtekből az akciós potenciál a sarcolemmán és a T-tubulusokon keresztül terjed az izomrost belsejébe. A sarcoplasmaticus reticulum (SR) terminális ciszternái a T tubulus két oldalán, szoros fizikai közelségben helyezkednek el: itt, a triádban találhatóak a dihidropiridin-receptorok (DHPR) és a rianodin receptorok (RyR). Minden második RyR szoros kapcsoltban áll egy DHPR-tetráddal. A triád két oldalán elkülönítve működik egy-egy kalcium-felszabadító egység (Calcium Release Unit, CRU). Feladata az elektromos ingerület mechanikai válasszá történő alakítása. A sarcolemma tartós repolarizációja a kalcium-felszabadulás kaszkádját megállítja, és az intracelluláris (ic.) Ca^{2+} visszavételeződik a raktárba.

A rianodin receptor egy kb. 2MDa 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 RyR csatorna-funkcióját fiziológiásan alapvetően maga a kalcium szabályozza: intracellulárisan nM-os koncentráció aktiválja, μM -os koncentráció gátolja a RyR nyitását. Emellett az SR lumenális Ca^{2+} koncentrációja is szabályozó szereppel bír: a magas SR Ca^{2+} -koncentráció fokozza a RyR nyitvatartási valószínűségét.

2. 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. Az elemi események legalapvetőbb formája a kalcium-spark. 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 ic. 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 fiziológiás kalcium-fluxusról.

3. A koleszterin

A koleszterin az emlős sejtmembrán fontos alkotóeleme, a membrán-fluiditás és permeabilitás modulátora. Az abnormális koleszterin-szint olyan, rendszer-szintű betegségek kialakulásához vezethet, mint az érelmeszesedés. Az érelmeszesedés patomechanizmusában alapvető szerepe van a keringő LDL és HDL koleszterinnek. A koleszterin a citoplazma endoplazmatikus retikulumában szintetizálódik acetilkoenzim A-ból. A sebességmeghatározó enzim a HMG-CoA-reduktáz, ami a HMG-CoA-mevalonát átalakulást katalizálja. A HMG-CoA reduktáz fiziológiás szabályozásában a képződött koleszterinnek van a legfontosabb szerepe: gátolja az enzim aktivitását és szintézisét. A HMG-CoA reduktáz enzim kompetitív gátlásával csökkentik a koleszterin-szintet a statinok. 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 T-tubulus membrán koleszterin tartalma módosítja az elektromechanikai kapcsolat kialakításában részt vevő fehérjék funkcióját (DHPR).

4. A statinok

1994-ben jelent meg a Scandinavian Simvastatin Survival Study, amelyben a kutatók 4444 hypercholesterinaemiás szívbeteget vizsgáltak. 5 éves követés során a simvastatint szedők szérum koleszterin-szintje 35%-al csökkent, és a szívinfarktusból eredő halálozás esélye 42%-al!

A statinok összefoglaló név alatt értjük a HMG-CoA reduktáz gátlók családját. A statinok gátolják az érelmeszesedés kialakulását, és ezért csak részben felelős a szérum koleszterin-szint csökkentés: pleiotrop hatásuk van. A kardiovaszkuláris mortalitás csökkenésében szerepet játszik az atherosclerotikus plakkok stabilizációja és az endothel funkció javítása, melynek háttérében a gátolt izoprenoid termelés (FPP és GGPP), a prenilált fehérjék mennyiségének csökkenése állhat. A statinok immunmoduláns hatása is ismert, és szintén a kis GTP-ázokhoz köthető, a MHC-II-n keresztül. A fluvastatinnak daganat-ellenes hatása is van: pl. hepatocellularis carcinómában gátolja a sejtosztódást, apoptózist indukál.

A statin-terápia mellékhatásaként leggyakrabban a különféle izom-problémák fordulnak elő (1-10%), ami sokszor a kezelés felfüggesztéséhez vezet. A statin-indukálta izompanaszok megjelenése dózisfüggő és csoport-hatás. Jellemző tünetei: szimmetrikus, proximális, és döntően nagy izmokat érintő változatos tünetek (myalgia, miopátia, myositis vagy myonecrosis) emelkedett kreatin-kináz (CK) értékkel. A

rhabdomyolízis a statin-kezelés legsúlyosabb és legrettegettebb mellékhatása, potenciálisan életveszélyes.

A statin-indukálta myopátia pontos patomechanizmusa nem tisztázott. Összességében a statinok koleszterin-csökkentő hatása károsodott membrán-integritáshoz vezethet, koenzim Q10 (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.

5. Koenzim Q10:

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, az ATP-termelés alapja. A keringő Q10 gátolja az oxidált LDL képződést, így véd az érlemezés kialakulása ellen. Mivel az izoprén váz létrehozása a koleszterin képzéssel közös útvonalon zajlik, a statinok csökkentik a Q10 szérumban koncentrációt (akár 40%-al). Ezért felvetődött oki szerepe a statin-kezelés mellékhatásaként jelentkező izom-panaszok hátterében. Statin kezelés mellett csökken a Q10 szérumban mért koncentrációja.

Célkitűzések

PhD munkám során célt volt a statin-kezelés vázizom-károsító hatásának modellezése, mechanizmusának vizsgálata. Statint alapvetően hypercholesterinaemiás betegek szednek, ezért célunk volt egy olyan állatmodell kidolgozása, amely biztonságosan reprodukálja ezt a humán állapotot. Ezt követően mind kontroll körülmények között, mind hypercholesterinaemia mellett terveztük vizsgálni a statin-kezelés vázizmot érintő hatását. A miopátia jelenlétét funkcionális vizsgálatokkal, izomerő-mérésekkel kívántuk bizonyítani, és fennállása esetén jellemezni. A kalcium az ic. jelátviteli útvonalak mellett a vázizom elektro-mechanikai kapcsolatában is alapvető szerepet játszik. Az izomroston belüli ic. kalciumion-koncentráció ($[Ca^{2+}]_i$) változásait racionális fluoreszcens festék segítségével terveztük kimutatni, és elemi kalciumfelszabadulási események elemzésével terveztük vizsgálni statin jelenlétében. Szerettük volna megvizsgálni, hogy a Q10 véd-e a statin-kezelés vázizmot érintő mellékhatásai 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.

Anyagok és módszerek

1. Állatmodell

Kísérleteink során a statinok családjából a fluvastatint alkalmaztuk. Hatáserőssége közepes, szervezeten belüli további metabolizáció nem szükséges az aktív molekula kialakulásához.

Kísérleteinket felnőtt nőstény Fisher patkányokon végeztük. Az állatokat különböző diéták segítségével kezeltük, melyek alapja a standard rágcsálótáp volt. A kísérletünk során az állatok az ételhez és vízhez ad libitum hozzáféréssel rendelkeztek. A kezelés hossza minimum 21 nap volt. A kontroll (K) állatok standard rágcsálótápot kaptak. A fluvastatin-tartalmú (S) diétát és a koenzim-Q10 (Q10) kiegészítést speciális, hypercholesterinaemiát (HC) indukáló körülmények között is alkalmaztuk. A HC diéta alapvetően magas koleszterin bevitelen alapult, azonban egyéb anyagokkal is ki kellett egészíteni, pl. felszívódást segítő kolsavval és tiouracyllal, ami pajzsmirigy-gátló hatással rendelkezik. A szer vázizmot érintő potenciális mellékhatása miatt a HC diéták esetében kontroll csoportként minden esetben csak tiouracyllal kezelt (TU) csoportot használtunk az eredményeink összehasonlításakor. A fluvastatin kezelések során az általunk használt gyógyszer-dózis (6,4 mg/kg/nap) a humán maximális dózis kb. ötszörösének felel meg, a koenzim Q10 dózisát (10 mg/kg/nap) szintén úgy határoztuk meg, hogy a humán dózist meghaladja.

2. Primer vázizom sejt-kultúra

A primer vázizom tenyészet létrehozása céljából 3-7 napos Wistar patkányokat áldoztunk fel. A hátsó végtagból a m. quadriceps femoris, a m. soleus, és a m. gastrocnaemius került eltávolításra. Mechanikai dissectiot követően enzimátikus emésztést végeztünk, majd FBS-tartalmú HAM F12 táptalajra szélesztettük a sejteket a sejt-prolifерáció elősegítése céljából. A sejt-kultúrát termosztátban inkubáltuk 24 órán keresztül. A primer sejt-kultúrákon random módon két kezelési csoportot hozunk létre. A kontroll sejteket lószérumot tartalmazó DMEM differenciáló tápoldatba helyeztük. A statin-kezelt csoport esetén a differenciáló médiumhoz 10 nM fluvastatint is adtunk. A tenyésztést még további 48 órán keresztül folytattuk.

3. Sejtprolifерáció és -differenciáció vizsgálata

A primer vázizom tenyészeteken a szélesztést követő 24 (kontroll), 48 és 72 óra elteltével fényképeket rögzítettünk egy inverz fénymikroszkópon. A képeken manuálisan megjelöltük a myogen magokat, azonosítottuk a többmagvú sejteket. A tenyésztési idő függvényében meghatároztuk a myogen magok abszolút számának alakulását. Elemzésre került az egy izomsejten belüli átlagos magszám és a fúziós index (a többmagvú sejtekben lévő myogen magok számát viszonyítja az egymagvú sejtekéhez), az izomsejtek differenciáltságának megítélésére szolgált. A többmagvú sejtek arányát is megvizsgáltuk a mononuclearis sejtekhez viszonyítva.

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

A kezelt, felnőtt Fisher patkányok pentobarbitál anesztéziában részesültek (27 mg/kg). Az aorta abdominalis kanülálásával vérmintát gyűjtöttünk. A Debreceni Egyetem Klinikai Központ Laboratóriumi Medicina Intézetében standardizált módszerekkel, automata berendezések segítségével határoztuk meg a vérumban mérhető össz-, LDL-, HDL koleszterin és triglicerid koncentrációt és a CK értékét.

5. Patológiai, szövettani vizsgálatok

Sectio során eltávolításra került a szív, a máj, a vese és a hátsó végtagból a m. extensor digitorum longus (EDL) és a m. soleus (Sol), rögzítésre került a szervek tömege. A szövettani feldolgozás során formalin pufferrel fixáltuk a mintát, az automata, parafin viaszos beágyazást követően mikrotommal szeleteket készítettünk, tárgylemezre való rögzítést követően hematoxilin-eozinnal festettünk. Az izom-metszeteken a miopátia jeleit kerestük, és meghatároztuk az izomrostok átmérőit. 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

A kontrakciós erő mérését a patkányok gyors típusú, EDL és lassú, Sol izmain egyaránt elvégeztük. Az izmokat Krebs oldattal perfundált kísérleti kamrába helyeztük, egyik végüket fixen rögzítettük, a másik véget egy kapacitív mechanoelektromos transzducerhez kapcsoltuk, elektromos ingerelést két platina elektróddal végeztük. Az izmok passzív feszülését transzducer segítségével addig növeltük, amíg maximális izomerő-választ kaptunk. Az egyedi rángásokat (twitch) rövid supramaximális ingerléssel váltottuk ki. Tetanust EDL izmok esetében 200 Hz frekvenciával 200 ms hosszú elektromos impulzus-sorozattal indukáltunk, Sol izmok esetében 100 Hz frekvenciával ingereltünk 300 ms időtartamig. A twitch és a tetanusz időtartamát (duration) a tranziens kezdetétől a maximális erő 90%-os relaxációjáig eltelt időben határoztuk meg. A Time To Peak (TTP) értékét a tranziens kezdetétől a maximális amplitúdó eléréséhez szükséges időtartamban definiáltuk. Az izmok fáradásának mérésekor 150 tetanuszt generáltunk egymás után, 2 s-os időeltérésekkel. Az utolsó tetanusz amplitúdóját az adott sorozatban lévő első tetanusz amplitúdójára normalizáltuk. 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.

7. Izolált vázizomrostok preparálása

A különböző diétával kezelt Fisher patkányokból a nyugalmi $[Ca^{2+}]_i$ -mérésekhez a mellső végtagi m. extensor digitorum communis-t (EDC) preparáltuk ki, az elemi események méréséhez az m. flexor digitorum brevis-t (FDB). Az izmokat FCS tartalmú

DMEM oldatban enzimatisz emésztésnek tettük ki (1-es típusú kollagenáz). Ca^{2+} -mentes FCS tartalmú Krebs oldattal mosást alkalmaztunk, majd óvatos triturálást végeztünk, hogy egyedi izomrostokat kapjunk. A mechanikai behatást követően a rostokat 20 percig pihentettük módosított Krebs oldatban. Ezt követően az izomrostokat üveg kapilláris segítségével óvatosan a mérőkádba helyeztük.

8. Nyugalmi intracelluláris kalcium-koncentráció meghatározása

A nyugalmi $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -t meghatároztuk mind a kezelt állatokból izolált vázizomrostokon, mind a primer tenyészetből származó vázizomsejteken is. Az izolált rostok és a tenyésztett sejtek fluoreszcens jelölése azonos módon zajlott. A mintát normál HEPES-Tyrode (nTyr) oldatba helyeztük és 5 μM Fura-2 AM (kalcium-érzékeny, ratiometrikus, fluoreszcens) festékkel feltöltést végeztük, majd lemosást alkalmaztunk. A mérést perfúziós kádban végeztük, nTyr oldattal perfundáltunk. Időben váltakozva történő kettős gerjesztést (340 és 380 nm) alkalmazva, az emittált fényt 510 nm-en detektáltuk inverz fluoreszcens mikroszkóppal, 40x olaj-immersiós objektívvel. Grynkiewicz egyenletét használva, a kalciumot nem kötött és a kalciummal teljesen telített festék fluoreszcencia hányadosából határoztuk meg a nyugalmi $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -t.

9. Elemi kalcium-felszabadulási események detektálása

Felnőtt Fischer patkányokból izolált vázizom-rostokat használtunk. Az FDB izmokon a sejtmembránt saponinnal permeabilizáltuk és 50 μM Fluo-3 fluoreszcens festékkel feltöltöttük. Majd a rostokat üveg aljú mérőkádba, kálium-szulfát tartalmú relaxáló belső oldatba helyeztük, amiben a méréseinket végeztük. A detektálást konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal (CLSM) végeztük 63x víz-immersiós objektívvel (NA 1,2). Argonion lézerrel gerjesztettük 488 nm-en, az emittált fényt 520 nm-nél regisztráltuk. A detektálás line scan módban történt: az idő függvényében ábrázolódtott a fluoreszcencia intenzitás változás térbeli lokalizációja. Az 512 pixel hosszúságú pásztázandó vonal a vázizomrost átmérőjével párhuzamosan került kijelölésre. Az 1024x512 pixel méretű képet egy automatikus esemény-felismerő program segítségével elemeztük, melyet a munkacsoportunk fejlesztett. A sparkok jellemzésére az alábbi paramétereket használtuk: az amplitúdó normalizált fluoreszcencia növekedés ($\Delta F/F_0$), vagyis az ebből számított $[\text{Ca}^{2+}]_i$ változás; a teljes időbeli hossz (duration); az amplitúdó eléréséhez szükséges idő (TTP) az SR-ből történő Ca^{2+} -felszabadulás időtartamára enged következtetni; a Full Time at Half Maximum (FTHM) maximális jelintenzitás, az amplitúdó 50%-os értékénél mért időtartam; a Full Width at Half Maximum (FWHM) az FTHM-hez tartozó térbeli szélesség, vagyis az amplitúdó 50%-nál mért térbeli kiterjedés.

10. Statisztikai analízis

Az azonos kezelési csoportból származó adatokat átlagoltuk. Az eredményeket átlag \pm standard hiba (SEM, standard error of the mean) 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 sejtenyészet 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.

Eredmények

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

A proliferáló médiumban a vázizomsejtek 24 óra alatt majdnem teljes konfluenciát értek el. Kontroll körülmények között a differenciáló médiumban további 24 óra alatt orsóformát vettek fel a sejtek, és számuk csökkent a vázizom-sejt fúzió miatt. További 24 óra elteltével a tárgylemezen teljes konfluenciát észleltünk és minden látótérben voltak több, mint tíz sejtmagot tartalmazó, nagy myotubulusok. A fluvastatinnal kezelt lemezeken 24 óra differenciáltatást követően az orsó formáció mennyisége elmaradt a kontroll tenyészetekhez képest, és további 24 óra múlva is sok kerek, nem differenciált sejtet lehetett látni. Alig volt észlelhető vázizom-sejt fúzió, és nagy myotubulusok szinte egyáltalán nem alakultak ki a tenyésztés során. 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.

Morfometriai analízis: a kontroll csoportban a myogen magok száma emelkedett a tenyésztés során. A 24 órás proliferációs fázis utáni állapotot tekintettük kiindulási értéknek minden csoportban (önkontrollos elrendezés), ehhez viszonyítva kaptuk a relatív magszámot. A K csoportban a referencia-érték 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. 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. A kontroll értékekhez viszonyítva a statin-kezelt csoport adatai szignifikánsan alacsonyabbak voltak mind a második, mind a harmadik tenyésztési napon. A fúziós index mind a K, mind a S csoportban konstans módon emelkedett, azonban a S csoport értéke szignifikánsan alacsonyabb volt mindkét napon. A tenyészet fejlettségét értékeltük az izomsejtek átlagos magszámának megadásával is. 48 óra tenyésztést követően a K csoportban átlagosan 2 magvú izomsejteket láthattunk, 72 óra elteltével 3 magvúakat. A fluvastatin jelenléte mellett az átlagos magszám szignifikánsan csökkent: 48 óra tenyésztési időnél még átlagosan mononukleáris izomsejteket számoltunk, 72 óra tenyésztésnél csak két magvúakat. 72 óra tenyésztési idő elteltével kontroll

körülmények között a legtöbb sejt 2-5 magvú volt. A több, mint öt maggal rendelkező sejtek/rostok 20%-ban fordultak elő átlagosan, és 5% több, mint 10 maggal rendelkező myotubulus volt. Azonban fluvastatin mellett 72 óra tenyésztést követően is az izomsejteknek még több, mint 50%-a mononuclearis volt, 40%-a 2-5 maggal rendelkezett, és az ettől is nagyobb, differenciáltabb izomsejtek/tubulusok csak összesen 6%-ban voltak jelen a tenyésztési idő végén. Összességében statin kezelés hatására szignifikánsan kevesebb izom eredetű sejtet kaptunk. A sejtproliferáció gátlása mellett a fluvastatin alkalmazásával az izomsejtek differenciálódása is elmaradt a kontroll tenyésztetben tapasztaltakhoz képest.

2. Anatómiai eredmények

A kezelések hatására az állatok átlagos súlya kis mértékben változott. A relatív, testtömeghez viszonyított izomtömeg a TU, HC és HC+S kezelési csoportokban kisebb volt a kontroll állatokhoz képest az EDL, 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 különbség. Statin kezelés hatására a K 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 S csoportban a K-hoz képest.

A patológiai feldolgozás során makroszkópos szervi eltérést nem észleltünk. Mikroszkópos vizsgálattal a májban a koleszterin-dús étrend (HC) hatására mérsékelt fokú zsíros degenerációt találtunk. A vese és a szív szerkezetében nem találtunk patológiás eltérést egyik kezelési csoportban sem. A vázizmok fénymikroszkópos vizsgálata során egyértelmű károsodás jeleit nem tudtuk kimutatni, a harántcsíkolat megtartott volt és gyulladásos jeleket sem észleltünk egyik kezelési csoportban sem. Azonban a S állatok izomrostjainak keresztmetszete nagy szórást mutatott, relatíve vastag és vékony rostok egyaránt előfordultak. A többi kezelési csoportra ez nem volt jellemző. A S 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: $1835 \pm 79 \mu\text{m}^2$ (n=161), S: $1448 \pm 44 \mu\text{m}^2$ (n=288); HC: $2065 \pm 82 \mu\text{m}^2$ (n=116); HC+S: $1664 \pm 44 \mu\text{m}^2$ (n=226). A K állatokhoz képest sem a HC, sem a TU csoportban mért keresztmetszetek nem különböztek szignifikánsan: TU: $1801 \pm 65 \mu\text{m}^2$ (n=128).

3. A szérumból mért koleszterin, triglicerid és CK koncentráció

A kontroll állatok szérumból mért koleszterin, triglicerid és CK értékeit a referenciatartományon belül mértük, és a HDL/LDL arány is megfelelt a rágcsálóknál megszokott erős HDL dominanciának. A diéta hatására a HC patkányok koleszterin értékei több, mint hétszeres emelkedést mutattak. Emellett a két lipoprotein aránya is megfordult: a HC állatok vérmintáiban az atherogén LDL dominált (az emberi szérumból koleszterin-arányokhoz hasonlóan), míg a protektív HDL csak az össz-koleszterin kb.

40%-a volt. A statin kezelés a lipoproteinek arányát nem befolyásolta. Az irodalmi adatok alapján a HMGCoA-reduktáz kezelés patkányoknál alapvetően a triglicerid koncentrációt csökkenti. A mi eredményeink is ezt támasztják alá, bár valószínűleg az alacsony mintaszám miatt statisztikailag nem szignifikáns a csökkenés mértéke.

A statin diéta mellett a szérum CK értékei szignifikánsan emelkedtek: a S állatok CK értéke kb. 1,5-szerese volt a kontrollnak. A HC diéta mellett alkalmazott statin jóval nagyobb arányban, kb. háromszorosára növelte a CK értékét, ami már vázizomkárosodásra, miopátia jelenlétére utal: a Statin Muscle Safety Task Force 2014 klasszifikációja alapján az enyhe izomnekrózis kategóriába sorolható, így bizonyítottan tekinthetjük az izomkárosodás jelenlétét. Sem a TU, sem a HC diéta nem emelte a CK értéket. Véleményünk szerint a CK alapvetően a vázizmokból származik, mivel szívizomkárosodásra (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 értéket alacsonyabb izomtömegek mellett detektáltuk.

4. Az intracelluláris nyugalmi kalcium-koncentráció meghatározásának eredményei

A tenyésztett vázizom sejtek nyugalmi intracelluláris kalcium-ion koncentrációja ($[Ca^{2+}]_i$) a S csoportban szignifikánsan kisebb volt, mint a kontroll csoportban, és a myotubulusok értékei további csökkenést mutattak a szatellita sejtek értékeihez képest is. Ezzel ellentétben a felnőtt állatokból izolált, fluvastatinnal tartósan kezelt izomrostok nyugalmi $[Ca^{2+}]_i$ -ja szignifikánsan emelkedett a kontroll állatokéhoz képest. Ez az emelkedés a koleszterin-kezeléstől függetlenül jelentkezett. 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 szignifikáns mértékben csökkentette a nyugalmi kalcium koncentrációt a kontroll értékhez viszonyítva.

5. Az izomerő vizsgálatának eredményei

A különböző diétás csoportokból származó izmok (gyors EDL és lassú Sol) kontrakciós erejét egyaránt meghatároztuk. Az izomkontrakciók időbeli lefolyása hasonló volt a TU és a HC diéta mellett. Azonban a statinkezelésben is részesülő HC+S csoportban mind a twitch, mind a tetanusz amplitúdója kisebb volt mind a HC, mind a TU csoporthoz képest, és a kontrakciók hossza is rövidebbnek adódott ebben a kezelési csoportban. 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 állatokban, és ez a tendencia az EDL esetében is

megfigyelhető volt, bár a különbség mértéke nem adódott szignifikánsnak. A HC+S csoportban mind a twitch, mind a tetanusz során elért maximális izomerő szignifikánsan kisebb a HC csoportéhoz képest mind a két izomtípus esetében (a HC és TU állatok között nem tudtunk szignifikáns különbséget kimutatni). Fontos azonban kiemelni, hogy a statinkezelt és hypercholesterinaemias csoportban az állatok izomrostjainak keresztmetszeti területe szignifikánsan kisebb volt, mint a HC állatoké. Az izomerőt a keresztmetszetre normalizálva sem a gyors, EDL izmok, sem a lassú, Sol izmok esetében nem volt szignifikáns különbség az izomerőkben (sem a twitch-ekében, sem a tetanuszokéban) a két kezelési csoport között. 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. (EDL izmok: HC twitch $17,6 \pm 3,1$ mN/mm² vs. HC+S $17,2 \pm 3,3$ mN/mm², HC tetanusz $31,5 \pm 5,8$ mN/mm² vs. HC+S $34,5 \pm 7,8$ mN/mm². Sol izmok: HC twitch $7,7 \pm 0,7$ mN/mm² vs. HC+S $7,0 \pm 0,7$ mN/mm², HC tetanusz $22,5 \pm 2,4$ mN/mm² vs. HC+S $20,2 \pm 4,5$ mN/mm²). Az izmok fáradását vizsgálva az EDL izmok estén nem tapasztaltunk szignifikáns mértékű különbséget az izomerő-csökkenés mértékében: TU csoportban a kezdő maximális erő $0,63 \pm 0,03$ -d részére csökkent az izomerő, $n=5$ vs. a HC csoportban $0,72 \pm 0,03$ $n=6$, és HC+S $0,76 \pm 0,0$, $n=8$. Azonban a Sol izmok esetében a HC+S csoport izmai szignifikánsan nagyobb mértékű fáradást mutattak mind a TU-hoz, mind a HC csoportéhoz viszonyítva. A TU kezelés mellett a fáradás mértéke $0,79 \pm 0,05$ volt, $n=7$, a HC csoportban $0,80 \pm 0,03$ -nak adódott, $n=6$; míg a HC+S kezelés mellett $0,64 \pm 0,06$, $n=9$. 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 nyugalmi $[Ca^{2+}]_i$ -t találtunk.)

A Q10 diétát fogyasztó állatok és a kontroll állatok között nem találtunk szignifikáns különbséget az izomerőben egyik izomtípuson sem ($n=5$ Q10 és $n=10$ K). Szintén nem volt szignifikáns különbség a twitch/tetanusz arányban sem a Q10 kezelésben részesülő és a kontroll állatok között. Nem találtunk szignifikáns változást a twitch vagy a tetanusz amplitúdókban a HC és HC+Q10 csoport között sem. A HC+S állatok csoportjához viszonyítva sem igazolódott szignifikáns mértékű különbség a HC+S+Q10 csoportok izomerő eredményeiben. Nem találtunk szignifikáns eltérést a kontrakciók időbeli lefutásában sem: az időtartam és a TTP értékei sem különböztek egymástól egyik kezelés-pár kombinációban sem. 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

Eredményeink szerint a statin kezelt (S) állatokból izolált FDB izomrostokon szignifikánsan ($p=0,033$) több elemi kalcium-felszabadulási eseményt (sparkot) tudtunk detektálni, mint a kontroll állatok rostjain. A S csoportban $2,24\pm 0,2$ Hz/sarcomer volt a kalcium-spark frekvencia, $n=17$ vs. K: $1,59\pm 0,1$ Hz/sarcomer, $n=21$. A kalcium-sparkok legtöbb morfológiai paraméterben (amplitúdó, FWHM, TTP) nem tapasztaltunk szignifikáns mértékű különbséget a kontroll diéta és a fluvastatin kezelés között. Kismértékű, de szignifikáns ($p=0,002$) eltérést tapasztaltunk a detektált sparkok időbeli hosszában. A S állatok izomrostjain mért sparkok hosszabbak voltak a kontrollhoz képest: $39,3\pm 0,3$ ms, $n=3962$, vs. K $37,8\pm 0,4$ ms, $n=1605$. Így megállapítottuk, hogy a fluvastatin emeli a kalcium-sparkok frekvenciáját, míg az egyes sparkok morfometriai paramétereit (amplitúdó, FWHM, TTP, duration) alig befolyásolta.

A HC állatok esetén nem találtuk szignifikáns eltérést a sparkok frekvenciájában a kontroll (normál koleszterin szinttel rendelkező) patkányokhoz képest (HC: $1,55\pm 0,17$ Hz/sarcomer, $n=21$, vs. kontroll: $1,59\pm 0,1$ Hz/sarcomer, $n=21$, $p=0,871$). 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. kontroll: $0,34\pm 0,003$, $n=1667$, $p<0,001$). A kalcium sparkok FWHM értéke is szignifikánsan kisebb volt a HC izomrostokban: (HC: $1,25\pm 0,02$ μm vs. kontroll: $1,33\pm 0,02$ μm , $p = 0,002$). A HC sparkok rise time értéke szignifikánsan hosszabb volt (HC: $17,5\pm 0,3$ vs. kontroll: $15,7\pm 0,3$ ms, $p<0,001$). Az elemi események duration értéke is szignifikánsan nagyobb volt a HC állatok esetén (HC: $41,1\pm 0,4$ vs. kontroll: $37,8\pm 0,4$ ms, $p<0,001$). 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.

A statinkezelt HC patkányok rostjain szignifikánsan nagyobb volt a kalcium-spark frekvencia (HC+S: $2,38\pm 0,26$ Hz/sarcomer, $n=18$, vs. HC: $1,55\pm 0,17$ Hz/sarcomer, $n=21$, $p=0,006$), tehát ugyanolyan irányú változást tapasztaltunk, mint a normocholesterinaemiás állapotban alkalmazott statinkezelés esetén. 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: $0,35\pm 0,002$). Emellett az FWHM is szignifikánsan ($p<0,001$) magasabb volt (HC: $1,25\pm 0,02$ vs. HC+S: $1,36\pm 0,02$ μm). 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). Az események időbeli hossza 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). Összességében a fluvastatinnal kezelt HC állatok esetén a sparkok amplitúdója magasabb, térbeli kiterjedése szélesebb és az időbeli lefutása rövidebb volt a HC állatokon detektált kalcium-sparkokhoz viszonyítva. Azonban ha a normokoleszterinaemiás S patkányokhoz viszonyítottuk a HC+S sparkok értékeit, akkor nem találtunk szignifikáns különbséget a kalcium- sparkok morfológiai paramétereiben, ezért úgy véljük, hogy a fluvastatin kezelés visszafordította vagy semlegesítette a hypercholesterinaemia által generált változásokat a spark morfológiában.

Nem találtunk szignifikáns különbséget a kalcium- spark frekvenciában a kontroll 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, $n=11$, $p=0,989$). A S+Q10 állatok izomrostjain szignifikánsan ($p=0,001$) kevesebb kalcium-sparkot detektáltunk, mint a S rostokon, a S+Q10 csoportban a spark-frekvencia a kontroll csoportnak megfelelő tartományba csökkent (S+Q10: $1,11 \pm 0,12$ Hz/sarcomer, $n=12$, vs. S: $2,33 \pm 0,21$ Hz/sarcomer, $n=15$). A spark amplitúdó szignifikánsan csökkent a Q10 kezelés hatására, a kontroll érték 90,8%-ára ($p<0,001$). A sparkok egyéb morfológiai paramétereiben nem találtunk szignifikáns különbséget a két kezelési csoport között. A Q10 csoportban a rise time a kontroll 96,9% volt ($p=0,1412$), az FWHM értéke a kontroll érték 100,3 %-a volt ($p=0,3202$), duration a kontroll érték 100,3%-ának adódott ($p=0,3049$). Összefoglalva azt tapasztaltuk, hogy a koenzim Q10 adagolás kivédte a fluvastatin spark-frekvenciára gyakorolt hatását és csökkentette a spark-amplitúdót, míg az összes többi paraméter nem változott szignifikáns mértékben. A S állatok esetében a Q10 ugyanolyan hatást váltott ki, mint a kontroll diéta mellett adagolva.

Diszkusszió, következtetések, új tudományos eredmények

1. Állatmodell

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. Azon betegeknél is ultrastukturális vázizomkárosodást lehet kimutatni, akiknek nincsenek miopátiás panaszai.

Létrehoztunk egy olyan állatmodellt patkányokon, ami megfelelően magas szérumban koleszterin-szinttel rendelkezik ahhoz, hogy a humán viszonyokat jó tudja modellezni. Az irodalomban koleszterin dús diéták hatására kb. két-ötösörös koleszterin koncentráció-emelkedést tapasztaltak a szérumban, a pajzsmirigy-működés gátlását mellett elért szérumban koleszterin koncentráció emelkedésének mértéke még alacsonyabb. Mi a két módszer kombinációját alkalmaztuk, így kb. nyolcszoros emelkedést tapasztaltunk a kontrollhoz képest. Azonban ismert, hogy a pajzsmirigy-

működés gátlásának vázizom-károsító hatása lehet. Ezért létrehoztunk egy olyan kontroll csoportot is, ahol csak a pajzsmirigy-működést gátló tiouracylt alkalmaztuk. Eredményeink alátámasztják, hogy az általunk észlelt vázizom-károsodás a fluvastatinnak köszönhető, és nem hozható összefüggésbe az állatok hypothyreoid státuszával.

2. Myopathia

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. Ezt a speciális izomkárosodás marker, a CK emelkedett értéke is megerősíti. 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. Így a vázizom károsodás funkcionálisan és biomarker szinten is megerősítésre került.

Primer tenyésztés során a tápközeghez adagolt fluvastatin csökkentette a vázizomsejtek proliferációját és elnyújtotta a differenciáció folyamatát. A vázizomkárosodás kialakulásából fiziológiásan az következne, hogy válaszként beindulnak a regenerációs folyamatok. A felnőttkori vázizom-regeneráció a rostok lamina basalis alatt elhelyezkedő prekursor sejtekből indul. A kísérletünk során azt tapasztaltuk, hogy a fluvastatin adagolás hatására éppen ezek a regenerációhoz szükséges, esszenciális folyamatok blokkolódnak: mind a kezdeti lépésben, a sejtproliferáció akadályozása révén, mind az útvonal későbbi elemeiben, a differenciációban tapasztalt elmaradás révén. Így a sejtenyésztésben kapott eredményeink alapján azt mondhatjuk, hogy a regeneráció lehetősége elvész a károsodott izmok számára statin kezelésben. Ennek hátterében feltehetőleg nem a sejtmembrán koleszterin-tartalmának csökkenése áll, mivel ismert, hogy akut koleszterin-depléció hatására (M β CD segítségével) a primer tenyésztett csirke-vázizomsejtek proliferációja fokozódik.

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

A fentiekkel egybehangzó módon a mi vizsgálataink során is határozottan emelkedett nyugalmi, $[Ca^{2+}]_i$ -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-felszabadulási események frekvenciáját, de az egyes sparkok kisebbek és lassabbak lettek. Az emelkedett szérum koleszterin koncentráció a sejtmembránokban is emeli a koleszterin-tartalmat. Egy korábbi, mesterségesen koleszterin-szegény membránú szív- és simaizom sejteken végzett tanulmány kimutatta, 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. Mivel eredményeink egybevágóak 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, továbbá, hogy fokozza az SR-ből történő kalcium-csorgást egészséges és RyR mutáns egerek izolált vázizmain. A

Simvastatin akut, in vitro alkalmazása során a kalcium homeosztázis zavarát írták le, és megnövekedett a sparkok amplitúdója mind egészséges humán, mind patkány izmokon. 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, 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. 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. Bár a Q10 adagolás klinikai hatékonyságáról ellentmondó eredmények születtek a statin-indukálta miopátia esetében, 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, és ismert, hogy a koenzim Q10 kiegészítés csökkenti a ROS szintet patkány vázizmon, eredményeink alapján úgy véljük, hogy a ROS-nak is szerepe van a statin-indukálta miopátia kialakulásában. Azonban eredményeink alapján nem észleltünk 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 kardiovaszkuláris prevenció hatékony gyógyszerei. A statin-asszociált miopátia patomechanizmusa a mai napig sem tisztázott. Munkánk során kidolgoztunk egy hyperkoleszterinaemiás (HC) állatmodellt. Kísérleteink során tartósan fluvastatinnal (S) és/vagy koenzim Q10-el (Q10) kezeltünk patkányokat, és az izomerőben és a kalcium- homeosztázisban bekövetkező változásokat vizsgáltuk. A HC állatok szérumszintű koleszterin koncentrációja több, mint hétszeresére emelkedett a kontrollhoz képest ($1,5 \pm 0,1$ vs. $10,7 \pm 2,0$ mmol/l; $n=15$ és 16). Az LDL/HDL arány is megnőtt ($0,29 \pm 0,02$ vs. $1,56 \pm 0,17$), amit a statin kezelés antagonizált, és megemelte a szérumszintű kreatin-kináz (CK) értékét. A tenyésztett myotubulusok proliferációs rátája és fúziós képessége csökkent S kezelés hatására, és a szatellita sejtek és myotubulusok nyugalmi intracelluláris kalcium koncentrációja ($[Ca^{2+}]_i$) is csökkent. Azonban a kifejlett vázizomrostok nyugalmi $[Ca^{2+}]_i$ -t emelte a fluvastatin kezelés (116 ± 4 nM vs. 151 ± 5 nM; $n=33$ és 34). Az S állatok m. extensor digitorum longus (EDL) rostjainak keresztmetszeti területe szignifikánsan csökkent. Mind az EDL, mind a m. soleus (Sol) izomereje csökkent, és a Sol izmon a twitch és tetanusz időbeli hossza is rövidült. A HC nem befolyásolta, a S kezelés emelte a kalcium-spark-frekvenciát, amit a Q10 oly módon antagonizált, hogy nem változott az egy esemény alatt felszabadult kalcium mennyisége. 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 igazolják a statin kezelés hatására kialakuló miopátia jelenlétét, csökkent izomerővel és emelkedett szérumszintű CK értékkel. Emellett alátámasztják a kalcium-homeosztázis szerepét a statin-asszociált miopátia kialakulásában, és a Q10 izompanaszokkal szembeni protektív hatásában.

Köszönetnyilvánítás:

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek: Prof. Dr. Csernoch Lászlónak az Élettani Intézet részéről, és Prof. Dr. Paragh Györgynek a Belgyógyászati Intézet részéről, amiért vállalták a témavezetésemet, segítettek az elméleti kísérletes munka és a klinikai relevanciáinak összekapcsolásában. Köszönettel tartozom kollegáimnak: Dr. Szentesi Péternek, Dr. Dienes Beatrixnak, 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, hogy értékes tanácsaikkal és ötleteikkel segítették 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 vizsgálatok során, Dr. Kovács Ilona főorvosnőnek, és Dr. Szombathy Zitának a szövettani vizsgálatok során nyújtott segítségét. Hálával tartozom Őri Rózának, Dr. Varga Attilánénak és Hadháziné Gyöngyinek a kísérletek előkészítésében; Orosz Józsefnek az állatokkal végzett munkában nyújtott segítségével. Ezúton szeretném külön köszönetemet kifejezni néhai Dr. Kertai Pál Professzor Úrnak a támogatásáért, a kiemelkedő szakmai segítségért, amit az állatmodell létrehozásában nyújtott. Köszönetet mondok az Élettani Intézet minden munkatársának a támogatásért. Végezetül szeretnék köszönetet mondani a családomnak és a jelenlegi kollégáimnak a biztatásért, a türelmükért.

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.



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





**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

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.

