

SEMMELWEIS EGYETEM
DOKTORI ISKOLA

Ph.D. értekezések

3345.

CSOMÓ KRISZTIÁN

Patobiokémia

című program

Programvezető: Dr. Csala Miklós, egyetemi tanár

Témavezetők: Dr. Kukor Zoltán, egyetemi docens

Dr. Varga Gábor, egyetemi tanár

A mitokondriális citokróm c vizsgálata és metodikai fejlesztés.

Doktori értekezés

Csomó Krisztián Benedek

Semmelweis Egyetem Doktori Iskola
Molekuláris Orvostudományi Tagozat



Témavezetők: Dr. Kukor Zoltán, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Varga Gábor, DSc., egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Miklya Ildikó, Ph.D., tudományos tanácsadó
Dr. Szabó Nóra Zsuzsanna, Ph.D., szakorvos

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Fazekas Árpád, DSc., egyetemi tanár

Tagok: Dr. Rakonczay Zoltán, DSc., egyetemi tanár

Dr. Zelles Tibor, Ph.D., egyetemi docens

Budapest

2026

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke:	4
1. Bevezetés (irodalmi háttér)	5
1.1. A citokróm fehérjék	7
1.2. A citokróm c fehérjék családja.....	7
1.3. Mitokrondiális Citokróm c.....	8
1.4. Kardiolipin	8
1.5. Praeclampsia	9
1.6. Statinok	10
1.7. Statinok hatása idegi sérülések esetén.....	12
1.8. Gerincvelő sértéses modellek.....	13
2. Célkitűzések	15
2.1. 1. célkitűzés (a citokróm c redukció vizsgálata)	15
2.2. 2. célkitűzés (a citokróm c redukció sebességének vizsgálata Mg^{2+} , illetve a Ca^{2+} ionok jelenlétében).....	15
2.3. 3. célkitűzés (a citokróm c redukció sebességének vizsgálata simvastatin, illetve pravastatin jelenlétében).....	15
2.4. 4. célkitűzés (glutation, mint légzési szubsztrát vizsgálata).....	15
2.5. 5. célkitűzés (pravastatin és simvastatin mitokondriális oxigénfogyasztásra gyakorolt hatásának vizsgálata).....	15
2.6. 6. célkitűzés (annak vizsgálata, hogy a pravastatin és a simvastatin közvetlenül befolyásolja-e a citokróm-c működését)	16
2.7. 7. célkitűzés (gerincvelő sértési protokoll minimálinvazívításának vizsgálata).....	16
2.8. 8. célkitűzés (annak vizsgálata, hogy az átdolgozott gerincvelő sértési protokoll mennyiben felel meg a 3R szabálynak)	16
3. Módszerek	17
3.1. Felhasznált anyagok, eszközök	17
3.2. Állatkísérletek.....	17
3.3. Citokróm c redukció mérése	18
3.4. Mitokondrium preparálás.....	18
3.5. Mitokondriális oxigén fogyasztás mérése	19
3.6. Az állatműtétek előkészítése.....	19
3.7. A beavatkozás területének megnyitása	20
3.8. Klasszikus gerincvelő sértéses modell protokollja.....	20

3.9.	Általunk fejlesztett, minimálinvazív gerincvelő sértéses modell protokollja.....	22
3.10.	Műtét utáni ápolás és nyomon követés	23
3.11.	Metszetkészítés	25
3.12.	Statisztikai analízis	25
4.	Eredmények:.....	26
4.1.	A glutation citokróm c általi oxidációjának jellemzése	26
4.2.	Szabad citokróm c (az intermembrán tér modellezése).....	26
4.2.1.	A pH hatása a citokróm c redukcióra	26
4.2.2.	A Ca^{2+} koncentráció hatása citokróm c redukcióra	27
4.2.3.	A Mg^{2+} koncentráció hatása a citokróm c redukcióra	28
4.2.4.	A NaCl hatása a citokróm c redukcióra	29
4.2.5.	Tiolok hatása a citokróm c redukcióra.	29
4.3.	Kötött citokróm c (az intermembrán kötött citokróm c modellezése).....	30
4.3.1.	Negatív töltésű foszfolipidek hatása a citokróm c redukcióra.....	31
4.3.2.	Ca^{2+} , Mg^{2+} és NaCl hatása a citokróm c redukcióra, foszfolipid jelenlétében	31
4.4.	Glutation, mint mitokondriális légzési szubsztrát	32
4.5.	A pravastatin és a simvastatin hatása a citokróm c redukcióra	34
4.5.1.	Mg^{2+} hatása a pravastatin és a simvastatin által módosított citokróm c redukcióra	35
4.5.2.	Kardiolipin hatása a pravastatin és a simvastatin által módosított citokróm c redukcióra	36
4.5.3.	Mg^{2+} , valamint kardiolipin együttes alkalmazásának hatása a pravastatin és a simvastatin által módosított citokróm c redukcióra	36
4.6.	A pravastatin és a simvastatin hatása a patkány máj mitokondrium oxigén fogyasztására.....	37
4.7.	Az eltávolított gerincvelő értékelése.....	38
5.	Megbeszélés.....	42
5.5.	Metodikai szempont a reaktív oxigén gyökök képződésének értékelése szempontjából	42
5.6.	Ca^{2+} és Mg^{2+} hatása a citokróm c felszabadulásra és aktivációjára.....	43
5.7.	A glutation, mint a mitokondriális légzési lánc szubsztrátja	43
5.8.	A citokróm c redukciós képessége glutation jelenlétében, a Mg^{2+} koncentráció változásának függvényében.....	43
5.9.	A citokróm c redukciós képessége glutation jelenlétében, a Ca^{2+} koncentráció változásának függvényében.....	44
5.11.	A citokróm c, valamint a glutation szerepe az apoptózis folyamatában.....	45
5.12.	Statinok apoptotózist befolyásoló hatása	48
5.13.	A statinok antitumor hatása.....	50
5.14.	A statinok szerepe a központi idegrendszer sérüléseinek esetében.....	53
5.15.	Minimál invazív gerincvelő sértéses modell.....	53
6.	Következtetések.....	55

6.5.	1. célkitűzés értékelése (a citokróm c redukció vizsgálata)	55
6.6.	2. célkitűzés értékelése (a citokróm c redukció sebességének vizsgálata Mg^{2+} , illetve a Ca^{2+} ionok jelenlétében).....	56
6.7.	3. célkitűzés értékelése (a citokróm c redukció sebességének vizsgálata simvastatin, illetve pravastatin jelenlétében)	56
6.7.	7. célkitűzés értékelése (gerincvelő sértési protokoll minimálinvazívításának vizsgálata).....	57
6.8.	8. célkitűzés értékelése (annak vizsgálata, hogy az átdolgozott gerincvelő sértési protokoll mennyiben felel meg a 3R szabálynak)	57
6.9.	További következtetések.....	57
6.10.	Összegzés.....	59
7.	Összefoglalás, Summary	62
8.	Irodalomjegyzék	64
9.	Saját publikációk jegyzéke.....	78
10.	Köszönetnyilvánítás:	81

Rövidítések jegyzéke:

cit – citokróom

cit c – mitokondriális citokróom c

CL - cardiolipin

TRIS/HCl – tris(hidroximetil)aminometán/HCl

GSH – redukált glutation

GSSG – oxidált glutation

Cys – cisztein

DTT – ditiotreitól

EDTA – etilén-diamin-tetraacetát

CL – kardiolipin

PA – foszfatidsav

PS – foszfatidil-szerin

NO – nitrogén monoxid

eNOS – endotheliális NO-szintáz

PTP – permeability transition pore

HMG-CoA – hidroximetil-glutaril-CoA

ROS – reaktív oxigén gyökök

VLDL – very low density lipoprotein

LDL – low density lipoprotein

pra – pravastatin

sim – simvastatin

tskg – testsúly kilogramm

tsg – testsúly gramm

WHO – World Health Organisation

HELLP – hemolysis, elevated liver enzyme, and low platelet

1. Bevezetés (irodalmi háttér)

A legtöbb emberi sejten találhatók mitokondriumok, melyek a sejt energiaellátásáért felelnek (kivételt képeznek az érett vörösvértestek). Egészséges sejtekben a mitokondrium fő funkciója a légzési lánc működtetésén keresztül az ATP termelése, vagyis a mitokondriumok képletesen a sejt erőműveinek tekinthetők. Az ATP teszi lehetővé a sejten belüli energiaátvitelt, azzal, hogy a terminális foszfátcsoportjának hidrolíziséhez kapcsolódhatnak endergonikus folyamatok (Johnson, Mercado-Ayon et al. 2021).

A mitokondriumok dupla membránstruktúrával rendelkeznek, a külső és belső membránok eltérnek összetételükben és áteresztőképességükben, mely lehetővé teszi aerob körülmények között az oxidatív foszforilációt és a terminális oxidációt. A külső membrán egyszerűbb összetételű, kb. 50-50% lipid és fehérje. Porin csatornák helyezkednek el a membránban, melyek lehetővé teszik az intermedier anyagcsere több köztiterméke számára az átjutást (Ruprecht and Kunji 2021). A két membrán között található az intermembrán tér, a belső membrán által határolva pedig a mátrix. A mátrixban található számos enzim, többek között a citrátkör-, a zsírsavoxidáció- és az aminosavsintézis enzimek. A belső membrán komplexebb összetételű, kb. 75% fehérje. Egyik nagyon fontos lipidkomponense a kardiolipin, ami a belső membrán lipidtartalmának kb. 20%-át teszi ki. A belső membránban helyezkedik el az ATP szintáz és a légzési lánc elektronátvivő rendszere. A mitokondriális légzési lánc négy komplexből áll (I., II., III. és IV. komplex). Ennek komponensei olyan prosztetikus csoportot tartalmazó fehérjék, melyek redoxfolyamatokra képesek. A metabolikus folyamatok ide konvergálnak, hogy végül a légzési lánc elemein áthaladva oxidoredukciós lépéseken a NADH-ról, illetve a FADH₂-ről az elektronok O₂-re jussanak és H₂O keletkezzen. Közben protonmotoros erő alakul ki ahogy a komplexek protont pumpálnak ki az intermembrán térbe; ezek a protonok a protoncsatornát tartalmazó ATP szintázon keresztül juthatnak vissza a mátrixba miközben ehhez kapcsolatosan ADP foszforilálódik ATP-vé. A rendszer működésének alapfeltétele a mitokondrium szerkezeti épsége (Henze and Martin 2003).

A citokróm c a légzési láncot alkotó fehérjék tagja, a III. és a IV. komplexek között foglal helyet, a mitokondrium belső membránjának intermembrán tér felé eső oldalán. In vivo, az elektronok a III. komplexhez a NADH-ról, a szukcinátról, vagy a zsírsavakról érkezhettek.

A citokróm c elsődleges szerepe az elektron szállítás az oxidatív foszforiláció során.

Fiziológiai körülmények között a citokróm c a mitokondrium belső membránjához kötött. Fiziológiai pH-n a citokróm c pozitív töltésű fehérje, amely főként az anionos lipidekhez köt, például a foszfatidil-szerinhez, vagy a mitokondriumra specifikus kardiolipinhez, elektrosztatikus, és hidrofób interakciók segítségével (Ott, Robertson et al. 2002). A citokróm c fontos szerepet játszik a terminális oxidáció folyamatában, az elektron transzport révén. A citokróm c nem membrán kötött formája, intakt mitokondrium és fiziológiai ionerősség esetén, elsődlegesen az intermembrán térbe diffundál (Cortese, Voglino et al. 1995). Ebben az esetben a citokróm c szolúbilis fehérje, a mitokondrium intermembrán terében elektront szállít a membrán kötött III. komplextől a citokróm c oxidázhoz (Gupte and Hackenbrock 1988, Cortese, Voglino et al. 1995).

Pro-apoptotikus körülmények között, például oxidatív stressz esetén, a citokróm c a citoszolba képes jutni (ami az intrinsic apoptotikus útban történő részvételt is jelenti), és képes a sejtmagba történő belépésre, ahol gátolja a nukleoszóma kialakulását (Alvarez-Paggi, Hannibal et al. 2017).

A citokróm c mitokondriális intermembrán térből történő kiszabadulása a citoszolba kulcs lépés a mitokondrium eredetű apoptózis esetén. A citokróm c kiszabadulás első lépése a citokróm c és a kardiolipin közötti kötés megszűnése. A kardiolipin oxidációja szükséges a citokróm c és a kardiolipin közötti kötés megszakadásához. A citokróm c az intermembrán teret a PTP-n (permeability transition pore) keresztül hagyhatja el a citoszol irányába, de ennek a mechanizmusnak a részletei nem teljesen tisztázottak (Morin, Pires et al. 2004).

In vitro a citokróm c redukálható többféle redukáló ágens segítségével, úgy mint ditiotreitollal, glutationnal, vagy aszkorbinsavval (Williams and Yandell 1985).

A glutation egy fontos antioxidáns; az emlős sejtekben a koncentrációja millimol-os nagyságrendbe esik (1-10 mM). A glutation szintézise aminosavakból történik a citoszolban. A glutation a mitokondrium külső membránján keresztül jut az

intermembrán térbe. A mitokondriumban található glutation koncentráció megegyezik a citoszolban találhatóval (egyes szövettípusoknál eltérést mutathat). A transzportja viszont nem magyarázható egyszerű diffúzióval. A glutation mitokondriumba történő juttatásához specifikus szállítófehérjék szükségesek (Ribas, García-Ruiz et al. 2014). A glutation koncentrációja a citoszolban és a mitokondriumban egyes eredmények szerint egyforma, de a mitokondriumban kissé magasabbat is mértek, mint a citoszolban (Wahlländer, Soboll et al. 1979, Pastore, Federici et al. 2003). Az intracelluláris környezetben a glutation főként redukált formában fordul elő, a GSH:GSSH arány 300-30:1, kivéve az endoplazmás retikulum esetében, ahol ez az arány 3-1:1 (Aon, Cortassa et al. 2007).

1.1. A citokróm fehérjék

A citokrómok (cit) olyan katalitikus fehérjék, melyek prosztetikus csoportként hemet tartalmaznak (Biochemistry 1992). A hem alatt tetrapyrrolicus vas kelátot értünk (Biochemistry 1992). A hemben található vasatom oxidációs állapotának változásán alapul az elektrontranszferben betöltött szerepük, mely alapján beszélhetünk ferrohem-ről és ferrihem-ről (Biochemistry 1992). Fényabszorpciós spektrumuk, a működésük és a hem csoport kötése alapján három családba oszthatjuk őket: a, b, c, illetve egy később bevezetett d családra (Biochemistry 1992). A továbbiakban a vizsgálataink szempontjából fontos citokróm c családot ismertetem.

1.2. A citokróm c fehérjék családja

A citokróm a és b családok esetében a hem nem kovalens módon kapcsolódik a fehérjéhez (Ádám 2006). A citokróm c fehérje család esetében kovalens módon (tioéter kötést képeznek Cys-en keresztül) kötött hem csoport található a fehérjék aktív centrumában (Biochemistry 1992, Ádám 2006). A család sokfajta, különböző funkcióval rendelkező tagból áll, egyes tagjai redox folyamatokkal járó kémiai reakciókat katalizálnak, míg más tagok elektron transzferben vesznek részt (Kalpage, Bazylianska et al. 2019).

A család három osztályra bontható, a méret, a fehérjestruktúra, a hem csoportok száma és a redoxpotenciál mértéke alapján (Ambler 1991).

I. osztály: 8-12 kDa közötti, egy hem-csoportot tartalmazó fehérjék. Típusosan 5 alfa-hélixet tartalmaznak (Alvarez-Paggi, Hannibal et al. 2017).

II. osztály: 4 alfa-hélixet tartalmaznak, egy hem-csoporttal (Kalpage, Bazylianska et al. 2019).

III. osztály: négy hem-csoportot, 4-5 alfa-hélixet és 2 béta-lemezt tartalmaznak. Alacsony redox potenciállal rendelkeznek (Kalpage, Bazylianska et al. 2019).

1.3. Mitokondriális Citokróm c

A mitokondriális citokróm c (továbbiakban cit c) a légzési láncban résztvevő fehérje, amely a III. és IV. komplexek között foglal helyet a mitokondrium intermembrán terében.

A szabad cit c képes oxidálni a glutationt, és az oxidált glutation elősegíti a cit c felszabadulását a mitokondriumból, mely az apoptotikus út aktiválásában játszhat szerepet. A megfigyelések szerint a Mg^{2+} pótlás általában előnyös hatású, azonban a humán placenta sejt kultúrák esetében a mM-os koncentrációban jelenlévő Mg^{2+} valójában fokozza a sejtek apoptózisát (Black, Yu et al. 2001).

Fiziológiás körülmények között a cit c 8 pozitív töltéssel rendelkezik az egyenlőtlenül eloszló ionizálható csoportjai révén. Ez kedvez a negatívan töltött molekulákkal történő interakcióknak, úgy mint a foszfolipidek poláros fejeivel, például a kardiolipinnel (Díaz-Quintana, Pérez-Mejías et al. 2020). A kapcsolódás ionos és apoláros kötéseken keresztül valósul meg. A membránkötött citokróm c csak a III. komplextől képes elektront fogadni, amelyet a IV. komplexhez juttat, a molekuláris oxigén redukciójához (Brzezinski, Moe et al. 2021).

1.4. Kardiolipin

A kardiolipin egy dimér struktúrával rendelkező difoszfátidilglicerin lipid. Négy alkilcsoporttal rendelkezik, és két foszfáttal. Egyedi szerkezete alkalmassá teszi, hogy

protoncsapdaként működjön (Schlame, Brody et al. 1993). A mitokondrium belső membránjának egyik domináns alkotóeleme, ugyanis itt a lipidek 20%-a kardiolipin. A mitokondriális légzési lánc komplexeinek működését is elősegíti. Kardiolipin szükséges a III. komplex negyedleges struktúrájának megőrzéséhez, illetve a komplex funkciójának fenntartásához. A IV. komplex (másnéven citokróm c oxidáz) enzimátikus működéséhez is szükséges kardiolipin: vizsgálatok kimutatták, hogy két CL molekula szükséges a cit c oxidáz enzimátikus működéséhez. A komplex négy elektront fogad négy citokróm c molekulától és egy molekuláris oxigénnek adja át, így két molekula vízzé alakítva a molekuláris oxigént (Gomez and Robinson 1999). A kardiolipin, szerkezete révén, protoncsapdaként működik, elősegítve a mitokondrium belső membránja körül a protongrádiens megőrzését és ezáltal az oxidatív foszforilációt (Haines and Dencher 2002). A kardiolipin továbbá szerepet játszik az apoptózis folyamatában is, bizonyos körülmények között elősegítve a citokróm c kiszabadulását a citoszólba a mitokondriumból (Belikova, Vladimirov et al. 2006).

A kardiolipinhez kötött cit c peroxidáz aktivitással bír. A cit c általi kardiolipin oxidáció az apoptózis meghatározó kezdeti lépése. A cit c a kardiolipin szignalizáció kulcs katalitikus molekulája, és nem egy egyszerű, passzív résztvevője. A cit c peroxidáz aktivitása a mitokondrium esetében protektív szerepet játszhat bizonyos körülmények között (Díaz-Quintana, Pérez-Mejías et al. 2020). A lipoid hidroperoxid vegyületek redukciója hidroxillá elősegíti a mitokondriális membránban az oxidatív stressz hatásának mérséklését, míg egyazon időben szignál molekulákat állít elő (Belikova, Tyurina et al. 2009).

1.5. Praeclampsia

A praeeclampsia egy, a terhesség alatt fellépő betegség, melyet a magas vérnyomás, illetve megemelkedett vizelet fehérjeszint jellemez. A 20. gesztációs héttől manifesztálódik (Eiland, Nzerue et al. 2012, 2013, Al-Jameil, Aziz Khan et al. 2013). A praeeclampsia kiemelkedik a többi magas vérnyomással járó, terhesség alatti állapotok közül, mivel nagy hatással van az anya és a magzat egészségére, ez az egyik vezető oka az anyai és a perinatalis mortalitásnak, illetve morbiditásnak világszerte (Steegers, von

Dadelszen et al. 2010). A praeclampsia kiváltó okai a mai napig nem tisztázottak, viszont visszavezethető a terhesség elején, a placentáció zavarára és progresszív endotheliális károsodásra (Stegers, von Dadelszen et al. 2010). Ezek a patofiziológiai változások a terhesség nagyon korai fázisában is jelen vannak, habár a magas vérnyomás (perzisztáló diasztolés vérnyomás, amely meghaladja a 90 Hgmm-t) és a proteinuria ($>0,3$ g/24 óra) általában a terhesség második felében mutatkoznak (Stegers, von Dadelszen et al. 2010). A terhességek 2-8 %-át érinti (Stegers, von Dadelszen et al. 2010). A rizikófaktorok közé tartozik az obezitás, a krónikus magas vérnyomás és a diabétesz (Stegers, von Dadelszen et al. 2010).

Az egyetlen biztos kezelési módszere a terhesség megszakítása, ezért korai manifesztálódás esetén természetesen a koraszülés mértékének csökkentése érdekében próbálják a terhességet minél hosszabb ideig fenntartani. (Stegers, von Dadelszen et al. 2010). Ez annak a kockázatával jár, hogy eclampsia, vagy HELLP (hemolysis, elevated liver enzyme, and low platelet) szindróma alakul ki, melyek szignifikánsan megemelik az anyai és perinatalis halálozást (Stegers, von Dadelszen et al. 2010). Anyai részről többszervi elégtelenség, illetve tónusos-klónusos rohamok léphetnek fel (Stegers, von Dadelszen et al. 2010).

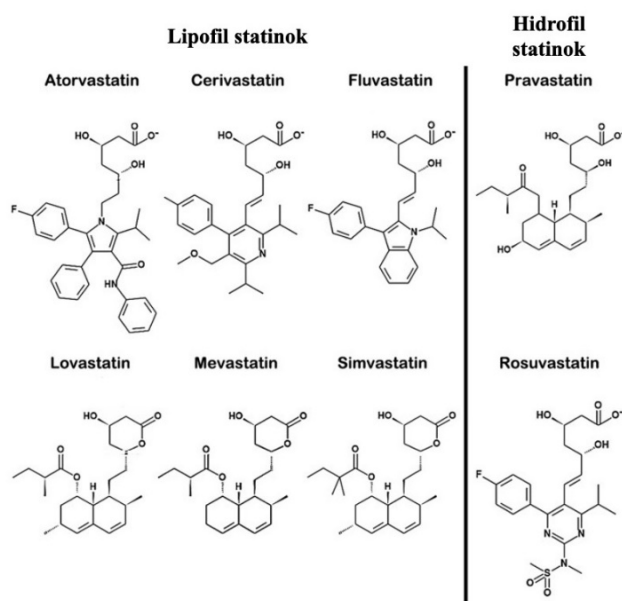
A kutatásunk szempontjából fontos, hogy a WHO a megelőzés szempontjából a Ca^{2+} pótlását, illetve a már kialakult magas vérnyomás mérséklésére a kalcium csatorna blokkolók alkalmazását ajánlja (Abalos, Duley et al. 2018, Hofmeyr, Lawrie et al. 2018). A magnézium szulfátot, mint antikonvulzív szert, mind megelőzésre, mind a kialakult eclampsiás görcsök kezelésére ajánlják (Altman, Carroli et al. 2002, Duley, Gülmezoglu et al. 2010). A magnézium-szulfát kezelés mellékhatásai nem voltak szignifikánsan különbözőek a placebotól, viszont a diazepam, phenitoin, nimodipin, lítikus koktél (klórpromazin, promethazin, pethidin keveréke) szignifikánsan jelentősebb és súlyos mellékhatásokkal jártak (1995, Duley, Gülmezoglu et al. 2010, Duley, Henderson-Smart et al. 2010, Duley, Henderson-Smart et al. 2010). Mindezek alapján a WHO a magnézium-szulfátot ajánlja elsőszámú kezelési alternatívaként (Altman, Carroli et al. 2002, Duley, Gülmezoglu et al. 2010).

1.6. Statinok

A statinok alapvetően a hiperkoleszterinémia kezelésére használt gyógyszerek, melyek a koleszterin szintézist csökkentik, a HMG-CoA reduktáz enzim blokkolásán keresztül. A specifikus gátló hatáson túl számos egyéb támadáspontjuk, illetve célmolekulájuk van, ezért pleiotrop hatásúaknak tekintjük őket. Ezek közül számos hasznos hatással bírnak, úgy, mint a VLDL és LDL szintek csökkentése, a vérnyomás enyhe csökkentése, gyulladásgátló hatás, neuroprotektív hatás, és antitumor hatás (Schmeer, Kretz et al. 2006, Jeon, Pandol et al. 2015).

Viszont a statinok számos negatív mellékhatással is jellemezhetőek, ilyen a viszonylag gyakorinak tekinthető rhabdomyolysis, myopathia, és az akut pancreatitis. Néhány statin, például a simvastatin, apoptózist indukálhat, de ennek pontos mechanizmusa teljesen még nem felderített. Viszont megfigyelték, hogy a simvastatin indukálta apoptózis esetén a cit c felszabadulás megemelkedik (Díaz-Quintana, Pérez-Mejías et al. 2020).

A statinokat az oldhatóságuk alapján feloszthatjuk lipofil (pl. simvastatin) és hidrofíl (pl. pravastatin) csoportokra (1. ábra). A lipofil és a hidrofíl statinok különböző mellékhatás profillal bírnak (Luisetto and Camozzi 2009, Agouridis, Kostapanos et al. 2015, Bonsu, Reidpath et al. 2015, Irwin, Khaledi et al. 2018).



1. ábra: Lipofil és hidrofil statinok. A statinok feloszthatóak hidrofil és lipofil statinokra, oldhatóságuk alapján. Az ábra Espano és munkatársai 2019-ben megjelent cikkében található ábra alapján készült. (Españo, Nam et al. 2019)

1.7. Statinok hatása idegi sérülések esetén.

A specifikus neuronális működést számos tényező gátolhatja, melyek kialakulhatnak lassú, progresszív módon (például Alzheimer-kór, Parkinson-kór), gyorsan, sérülések, vérzések esetén, de tartós gyógyszeresedés is okozhat zavarokat a neuronális működésben (például antiepileptikumok). Irodalmi adatok alapján a statinok a neuronális működést befolyásolhatják, mind az apoptózis irányában, mind neuroprotektív irányban (haematoma felszívódásának gyorsítása, angiogenezis – és neurogenezis elősegítése, a cereбрalis oedema csökkentése) (Chen, Ding et al. 2019). Az irodalmi adatok ellentmondásosak, ugyanis más vizsgálatok a perihaematomális oedema növekedését mutatták ki amennyiben a statinok szedését az agyvérzést követően kezdték meg, míg azon esetben, ha a statinok szedése az agyvérzést megelőzően indult, vagy az agyvérzést követően azt leállították, nem volt kimutatható szignifikáns különbség a haematoma tekintetében (Sprügel, Kuramatsu et al. 2021). Parkinson-kór esetében a statint szedő páciensek esetében szignifikánsan csökkent a dopamin-transzporter mennyisége, valamint az állapotuk romlása is szignifikánsan

gyorsabbnak bizonyult a statint nem szedőkéhez képest (Jeong, Lee et al. 2021). Alzheimer-kór és demencia vonatkozásában végzett metaanalízis alapján a statint szedők esetében a kórképek kialakulásának esélye csökkent. A vizsgálat során a hidrófil és a lipófil statinok hatását külön elemezték és mindkét esetben szignifikáns volt a különbség (Olmastroni, Molari et al. 2022).

Az agyi ischémiát olyan molekuláris változások jellemzik, amelyek apoptózist indukálására képesek, ilyenek a szabadgyökök és a kalcium koncentrációjának növekedése (Radak, Katsiki et al. 2017). A központi idegrendszeri neuronok és gliális sejtek esetében a statinok hatását *in vitro* vizsgálva az apoptózist, dózisfüggő módon megvalósuló spinalis motoneuron pusztulást mutattak ki, amely a neuromuszkuláris kórképek romlását okozhatja (Murinson, Haughey et al. 2012).

1.8. Gerincvelő sértéses modellek

A mitokondriális működés és a statinok apoptózist kifejtett hatásának vizsgálatát szeretnénk kiterjeszteni a neurális sérülések esetére is, melynek vizsgálati módszerei közül a vizsgálataink szempontjából a nyílt gerincvelő sértéses módszert szeretnénk a későbbiekben alkalmazni. Mivel ennek alkalmazása során számos probléma merülhet fel, ezért ennek finomítását és a lehetőségekhez képest minimál invazívvá történő alakítását tűztük ki célul.

A gerincvelő sérülések, sajnos, relatív gyakori sérülések (Lo, Chan et al. 2021). A gerincvelő sérülés esetén több módon is komplikáció léphet fel, például fertőzés révén, ezért is különösen fontos, ezen sérülések széleskörű kutatása (Failli, Kopp et al. 2012). Mivel a gerincvelő sérüléseknek nincsen egységes, definitív terápiája, állatmodellek szükségesek a lehetséges terápiák és folyamatok vizsgálatához (Kjell and Olson 2016, Guan, Chen et al. 2020). A jelenlegi technikai lehetőségek már bizonyos esetekben részleges megoldást nyújthatnak gerincvelői sérülések esetén, ezekhez szükséges a megfelelő laboratóriumi háttér, megbízható *in vivo* vizsgálati módszerrel (Lorach, Galvez et al. 2023). Annak ellenére, hogy a zárt sérülések a leggyakrabban modellezettek (kompresszió és kontúzió), klinikailag fontos, hogy a lacerációt is vizsgálni tudjuk, amelyet viszont csak nyitott módszerrel tudunk modellezni (Minakov,

Chernov et al. 2018). A nyitott modellek során a gerincvelő teljes-, vagy részleges átvágása történhet meg, amelyek segítségével precízen szimulálható a seb lokalizációja, ellentétben a zárt modellel, ez a sérülések természetéből adódik (kontúzió, illetve sebészi vágás). A nyitott sértéses vizsgálatok fényt deríthetnek a specifikus neurális sérülések patofiziológiájára kontrollált, megbízható és ismételhető módon (Borbély, Csomó et al. 2017). A teljes-, vagy a részleges gerincvelő átvágás egy széles körben használt nyitott sértéses technika, és részletesen ismertetett (Brown and Martinez 2019).

A patkányokon végrehajtott nyitott gerincvelő sértések esetében számos állat esetében jelentkeztek a sebészeti beavatkozásból származó problémák: csontszilánk kerül a gerincvelő állományába, amely duzzanatot okoz; a nagy csontsebnek hosszú időre van szüksége a gyógyuláshoz; a beavatkozás túl hosszú ideig tart. Ezeknek a problémáknak a megoldására fejlesztettünk ki egy új technikát.

Minden nyitott sértéses technikának része a dura megnyitása (Taoka and Okajima 1998). Számos friss tanulmány vizsgált különböző, újonnan fejlesztett technikát, a korábbi módszerek javítása céljából (Hou, Saltos et al. 2018, Mattucci, Speidel et al. 2019). Annak ellenére, hogy a dura megnyitását nem tudjuk kikerülni az új technika alkalmazása során, kisebb sebet ejtünk a durán, ami egy megbízható, kontrollált gerincvelő sértés alapja. A gerincvelő sértési technikák irodalmi áttekintése alapján elmondható, hogy számos szerző próbálta minimalizálni a beavatkozás idejét, az eredeti technika kisebb változtatásaival (Ahmed, Alam et al. 2019). A laminektómia minden esetben része a sebészi beavatkozásnak, annak ellenére, hogy a kivitelezése időigényes és nagy csontsebet eredményez (Brown and Martinez 2019). Ez a sebészi technika azon kutatások esetében lehet hasznos, ahol nyitott gerincvelő sértéses modellt használnak, teljes, vagy részleges gerincvelő átmetszéssel az intervertebrális tér szintjében (2. ábra).

2. Célkitűzések

2.1. 1. célkitűzés (a citokróm c redukció vizsgálata)

Megvizsgálni, hogy a membránkött és szabad citokróm c redukciója glutationnal hogyan változik a pH függvényében.

2.2. 2. célkitűzés (a citokróm c redukció sebességének vizsgálata Mg^{2+} , illetve a Ca^{2+} ionok jelenlétében)

Megvizsgálni, hogy a Mg^{2+} , illetve a Ca^{2+} ionok befolyásolják-e a citokróm c redukciójának sebességét, továbbá érdekelt bennünket, hogy a szabad és a membránkött formák között van-e különbség a Mg^{2+} , illetve a Ca^{2+} ionok hatása között.

2.3. 3. célkitűzés (a citokróm c redukció sebességének vizsgálata simvastatin, illetve pravastatin jelenlétében)

Megvizsgálni, hogy simvastatin és pravastatin hatására megváltozik-e a citokróm c redukció sebessége glutation jelenlétében.

2.4. 4. célkitűzés (glutation, mint légzési szubsztrát vizsgálata)

Annak vizsgálata, hogy a glutation lehet-e a mitokondrium légzési szubsztrátja.

2.5. 5. célkitűzés (pravastatin és simvastatin mitokondriális oxigénfogyasztásra gyakorolt hatásának vizsgálata)

A pravastatin és simvastatin befolyásolhatja-e a mitokondrium oxigénfogyasztását glutation jelenlétében?

2.6. 6. célkitűzés (annak vizsgálata, hogy a pravastatin és a simvastatin közvetlenül befolyásolja-e a citokróm-c működését)

A pravastatin és a simvastatin célpontja lehet-e a citokróm c?

2.7. 7. célkitűzés (gerincvelő sértési protokoll minimálinvazívításának vizsgálata)

A korábbi, általánosan elterjedt gerincvelő sértési protokoll átdolgozása gyorsabb, kisebb csontsebet eredményez-e?

2.8. 8. célkitűzés (annak vizsgálata, hogy az átdolgozott gerincvelő sértési protokoll mennyiben felel meg a 3R szabálynak)

A gerincvelő sértéses modell átdolgozása a 3R szabálynak megfelelt-e? Ezáltal alkalmasabb lehet-e a statinok apoptózisban betöltött vizsgálatához a tradicionális módszerhez képest

3. Módszerek

3.1. Felhasznált anyagok, eszközök

Foszfatidil-szerin (Sigma Aldrich Kft. Budapest, Magyarország), foszfatidilsav (Sigma Aldrich Kft. Budapest, Magyarország), glutation (Sigma Aldrich Kft. Budapest, Magyarország), kardiolipin (Sigma Aldrich Kft. Budapest, Magyarország), szarvasmarha citokróma c (Sigma Aldrich Kft. Budapest, Magyarország), simvastatin (Sigma Aldrich Kft. Budapest, Magyarország), pravastatin (– La Jolla, California, USA), Augmentin (1000 mg/200 mg por) (GlaxoSmithKline, UK), Betadine (EGIS, Magyarország), Calypsol (Richter Gedeon, Magyarország), CP XYLAZIN 2% (Produlab Pharma B.V., Hollandia), fiziológiás sóoldat (0.9% NaCl) (Fresenius Kabi, Németország).

Az egyéb felhasznált anyagok a Reanal Laborvegyszer Kft-től (Budapest, Magyarország) kerültek beszerzésre.

180-200 g Wistar hím patkányok (Kísérleti Orvostudományi Kutató Intézet).

Sebészeti mikromotor (MF-TECTORQUE, W&H, Ausztria), fogászati csontesipő (BS 0127, Dentsply, Magyarország), sebészeti mikroszkóp (OPMI19-FC, Zeiss, Németország), raspatórium (FK 1164, Dentsply, Magyarország), retraktor (RT 1253, Dentsply, Magyarország), szikenyél (RT 1253, Dentsply, Magyarország), szikenyél (BB 173, Dentsply, Magyarország), Szikepenge “12” (B. Braun, Németország), Szikepenge “20” (B. Braun, Németország), steril vágott géz 10x10 cm (Sterilux, Hartmann, Németország), varrófonalak “4-0” (monofilament, szintetikus; felszívódó és nem felszívódó) (B. Braun, Németország), csipesz “13 cm” (BD 1555, Dentsply, Magyarország).

3.2. Állatkísérletek

Minden állatokon végzett beavatkozást az Európai Unió előírásainak (2010/63/EU) megfelelően végeztünk, valamint vizsgálataink a magyar Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal engedélyének (PEI/001/2894-11/2014) megfelelően történtek.

Minden, a vizsgálatainkra vonatkozó szervezeti, kormányzati szabályzatot, illetve etikai elvárást figyelembe vettünk, és megfeleltünk ezeknek.

3.3. Citokróm c redukció mérése

A citokróm c redukciót Hitachi U2001 típusú spektrofotométerrel mértük. A mérés 550 nm hullámhosszon történt (Sanders, Harrison et al. 1994). Az oldatokat a méréshez használt küvettában készítettük elő, 25 °C-on. A reakció kezdetét a citokróm c oldathoz történő adása indította meg, a mért oldat végső térfogata 100 µl volt. A mintákat szűkített küvettában mértük össze, többszöri, óvatos pipettába történő visszaszívással homogenizáltuk, a buborékokat eltávolítottuk, majd a mérés a 20. másodpercnél (a citokróm c oldathoz történő adását követő 20. másodperc) kezdődött. A technikai kivitelezhetőség miatt a spektrofotométer működő állapotban volt a mérések előkészítésétől (oldat összeállítása, homogenizáció, a reakció lezajlása) fogva, hogy a mérést a citokróm c hozzáadásakor megindíthassuk. A mérés 3 percen keresztül zajlott. A reakció kezdeti sebességét a 60 másodperces abszorbancia meredekségéből számítottuk lineáris regresszió segítségével ($\epsilon = 21.000 \text{ l/mol} \cdot \text{dm}^3$).

A küvetták áttisztítása az alábbiak szerint történt: kétszeri átmosás desztillált vízzel, majd háromszori átmosás etanollal, amelyet újabb kétszeri desztillált vizes átöblítés követett.

Az inkubációs oldat összetétele: 100 µl végtérfogatot használtunk minden fotometriás mérésnél. 100 µM cit c, 40mM Tris/HCl (pH 8,0; 7,4, vagy 7,0), vagy 40 mM NaHCO₃ (pH 6,0 és 6,5); 1 mM GSH volt; a CaCl₂, vagy a MgCl₂ koncentrációk a vizsgálatoknak megfelelően voltak beállítva. A mikromoláris kalcium koncentráció beállítása a Ca-EDTA komplex segítségével történt (Bartfai 1979).

3.4. Mitokondrium preparálás

A mérésekhez 180-200 g közötti Wistar hím patkányokat használtunk. Az állatokat CO₂ atmoszférában 3 percig való tartással öltük meg. A mitokondriumokat az eltávolított májból preparáltuk, a Clayton és Shadel által leírt protokollnak megfelelően (Clayton and Shadel 2014). A májat 4°C-os Ca-Mg mentes Hank's 4 pufferben mostuk,

borotvapengével 1-2 mm széles szeletekre vágtuk. A darabokat kétszer öblítettük homogenizáló pufferben. A májdarabokat a homogenizáló puffer oldathoz adtuk (1:10 = súly/térfogat arányban), majd a homogenizáció Potter-Elvehjem homogenizátorban történt meg. A felülúszót 1200 g-n 10 percen keresztül centrifugáltuk, majd a centrifugálást 5-szörös térfogatú homogenizáló pufferben történő reszuszpendálást követően megismételtük. Az így nyert felülúszót 11000 g-n 15 percen keresztül centrifugáltuk a mitokondrium kinyeréséhez. A kinyert mitokondriumokat kétszer reszuszpendáltuk homogenizációs puffer oldatban, majd újból centrifugáltuk 11000 g-n 15 percen keresztül. A végső mitokondrium pelletet reszuszpendáltuk homogenizáló oldatban. A mitokondrium a preparálást követően azonnal felhasználásra került.

Módosított biuret reakció segítségével határoztuk meg a mitokondriális fehérje koncentrációt (Kruger 1994).

A homogenizáló puffer összetétele: 210 mM mannitol, 70 mM szacharóz, 5 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA (pH 7,5).

3.5. Mitokondriális oxigén fogyasztás mérése

A légzési rátát a mitokondriális oxigénfogyasztás alapján határoztuk meg. A mérés során Clark-típusú elektródot használtunk, 3 ml-es zárt kamrában, 37 °C hőmérsékleten, keverés mellett.

A mitokondriumok (1 mg fehérje /ml) inkubációja 250 mM szacharóz, 5 mM glutation és 40 mM Tris/HCl (pH 8,0; 7,4, vagy 7,0), vagy NaHCO₃ (pH 6,0 és 6,5) oldatában történt. A vizsgálatok felállításának megfelelően az oldatot MgCl₂, CaCl₂, EDTA, vagy ADP megfelelő koncentrációjával egészítettük ki.

3.6. Az állatműtétek előkészítése

A beavatkozás alatt használt összes eszköz sterilen került felhasználásra.

Profilaxisként szubkután antibiotikumot adtunk.

Az állatokat 1 óra hosszan keresztül akklimatizáltuk a műtő helységben, a stressz szint csökkentése érdekében.

Az anesztéziát intramuszkuláris injekcióval (80 mg/tskg ketamine, és 8 mg/tskg xylazine) végeztük.

A patkányokat melegen tartottuk végig a beavatkozás alatt, amelyhez melegített padot, vagy infravörös melegítőt használtunk, az állatok szemét folyamatosan nedvesítettük fiziológiás sóoldat cseppekkel (szükség szerint ismételve).

Az állatot rögzítettük a műtői padhoz, sebészi ragtapasz segítségével, a végtagjain, a farkán, és amennyiben a sértés helye engedte, a nyakánál is.

Steril sebészi varrófonál segítségével a felső front fogakat rögzítettük a műtői padhoz. A nyelvet kihúztuk, a légutak átjárhatósága érdekében.

A beavatkozás helyének megfelelően, attól minden irányban 2-2 cm szélességben eltávolítottuk a szőrt.

A sebészi beavatkozás területének megfelelően a bőrt háromszor fertőtlenítettük povidon-jód oldat és steril géz segítségével. Különös gonddal ellenőriztük, hogy minden szőrszálat eltávolítsunk a területről.

Az anesztézia ellenőrzését a talpak és a farok megcsípésével ellenőriztük, az első bemetszés megejtése előtt. Az anesztézia mértékét folyamatosan monitoroztuk a beavatkozás során.

3.7. A beavatkozás területének megnyitása

A bőr bemetszéséhez 20-as jelzésű szikepengét használtunk. A terület megnyitásához 2-2,5 cm hosszan a gerinc középvonalának megfelelően átvágtuk a bőrt teljes vastagságban. A bemetszés helyének meghatározásához a megfelelő csigolyákat kitapintottuk és az intervertebrális területet tekintettük a metszés középpontjának.

A seb széleit mobilizáltuk az izmokról, a kötőszöveti réteg preparálásával.

A gerincen tapadó izmokat a processus spinosusok mellett, két párhuzamos metszéssel különítettük el. A periosteumról az izmokat tompán távolítottuk el, raspatorium segítségével. Az izmok eltávolítása két csigolyának megfelelően történik. A jó rálátás biztosítása érdekében a sebszéleket retraktor segítségével tartottuk el.

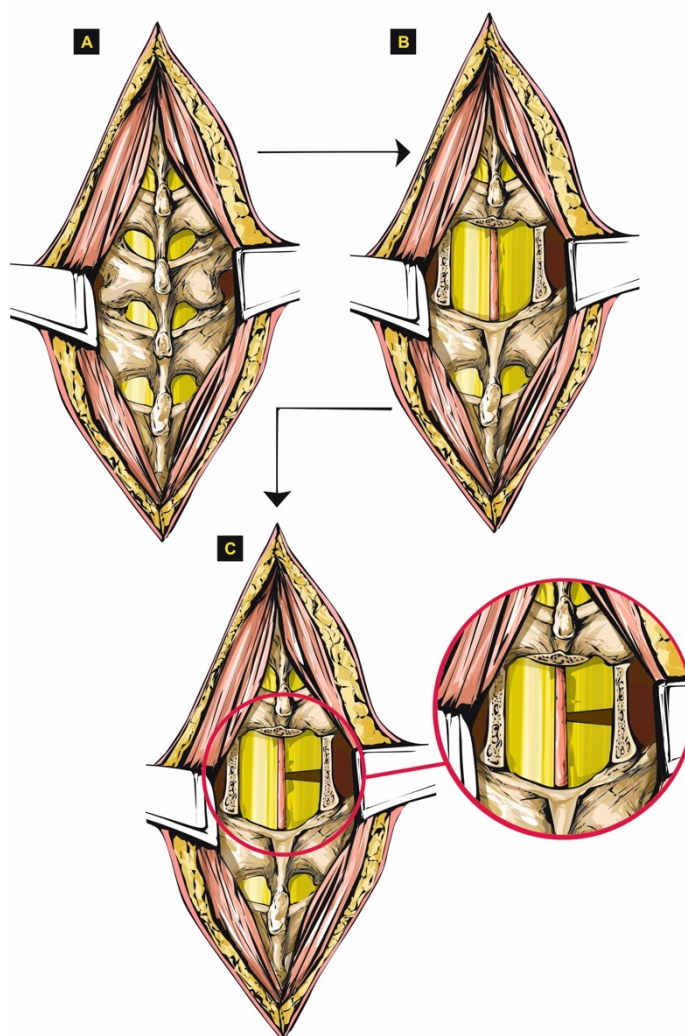
A beavatkozások során a vérzés kontrollálására steril gézlapot használtunk.

Eddig a pontig a két műtői technika lépései megegyeznek.

3.8. Klasszikus gerincvelő sértéses modell protokollja

4x-16x nagyítás mellett, fogászati sebészeti mikromotort és egyenes kézidarabot használva, az L1-es csigolyán laminektómiát hajtottunk végre. A lamina eltávolítását követően a durát megnyitottuk. A gerincvelőt féloldalt átmetszettük a jobb oldalon, a 4. lumbális szegmensnél, mikrosebészeti szikét használva. A gerincvelő középvezetékét a vena mediana posterior jelölte ki, amely a sulcus mediana dorsae-ben fekszik.

A sebzés folyamán a durát nem zártuk közvetlenül, de szorosan egymás mellé helyeztük, melyet a szorosan zárt felső rétegek (izmok, kötőszövet és a bőr) tartottak a helyén. A rétegeket egyenként rögzítettük varratokkal (Borbély, Csomó et al. 2017).



2. ábra: A klasszikus gerincvelő sértési technika bemutatása. (A) A sebési terület megnyitása. (B) Laminektómia (L1 csigolya). (C) Hemisekció (4. lumbális szegmentum). Az ábrát Ángyán Gergely készítette.

3.9. Általunk fejlesztett, minimálinvazív gerincvelő sértéses modell protokollja

Ebben az esetben nincs szükség laminektómiára. A Th13 és L1 csigolyák processus spinosus-át fogászati csontcsípő segítségével távolítottuk el, így javítva a terület átláthatóságát. Ennek következtében a további beavatkozást nagyítás (4x-16x) mellett, sebészeti mikroszkóp segítségével tudtuk elvégezni.

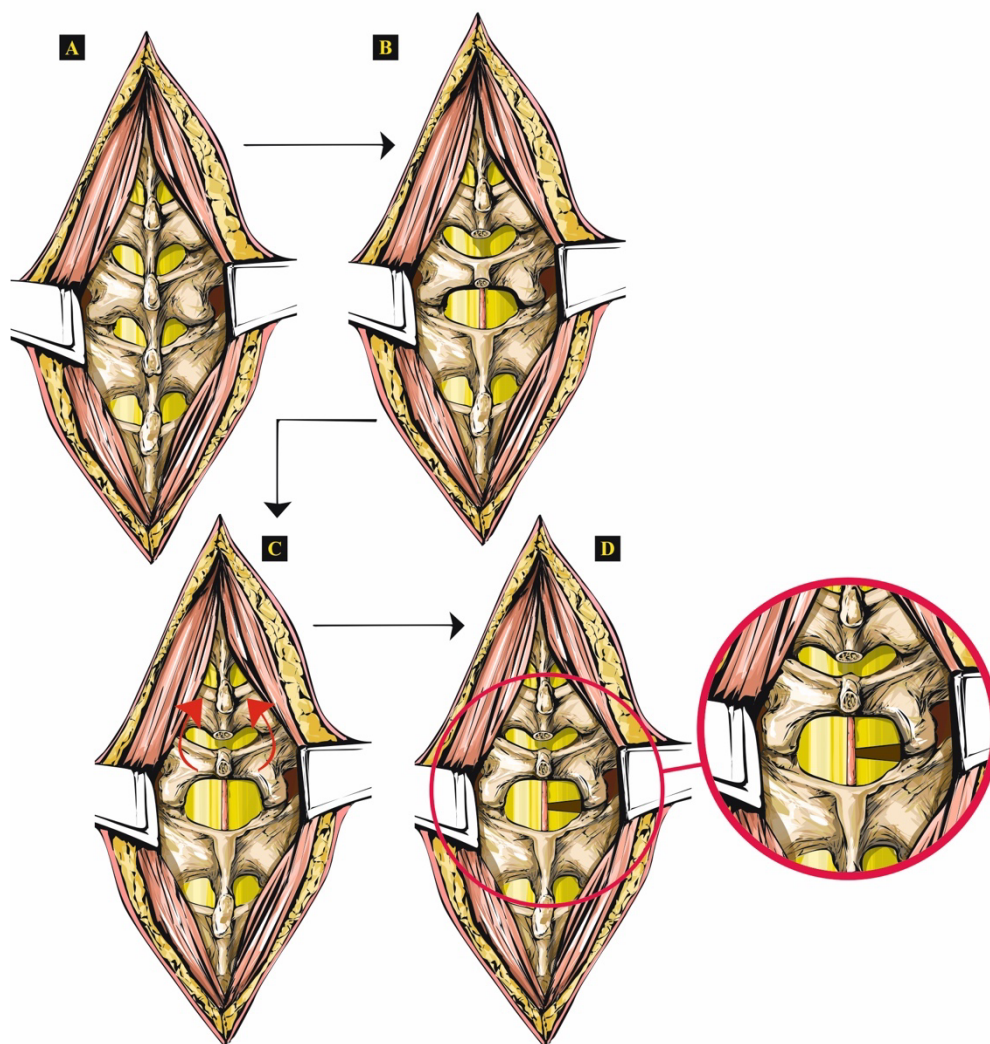
A caudalis csigolya processus spinosusanak megmaradt részénél fogva a csigolyát óvatosan megemeltük. Átvágtuk a ligamentum flavum-ot, hogy a gerincvelőt elérhessük. A caudalis processus spinosus-t tovább emeltük, és elérhetővé vált a gerinc dura mater-e, melyet szintén átvágtunk. A caudalis processus spinosust tovább emeltük, a cranialis irányba, hogy közvetlenül ráláthassunk a pia mater-re.

A pia mater esetében megkerestük a vena mediana posteriort, amely a gerincvelő középvonalát jelzi.

A vena mediana posterior lefutása szerint végeztünk bemetszést mikrosebészeti szikével, a vena sértését elkerülve. A bemetszést a vena alatt megejtve a gerincvelő állományában féloldali átvágást hoztunk létre az anteroposterior irányban, majd a pengét a középvonal felől laterálisan mozgatva az féloldali átmetszést megvalósítottuk. A bemetszés megejtése során a megfelelő erő alkalmazása mellett az arteria spinalis anterior nem sérül.

A dura matert nem zártuk közvetlenül. Az izmokat szorosan zártuk varratokkal (4-0 méret), végig a processus spinosusoknak megfelelően, ezzel indirekt záródást biztosítva a dura maternek.

A dorsalis kötőszövetet varratokkal zártuk. Végül a bőrt is varratok segítségével zártuk.



3. ábra: A rajz mutatja a nyitott gerincvelős sértéses módszer lépéseit patkány esetében. (A) A feltárt csigolya. (B) A processus spinosusok eltávolítása (Th13 és L1). (C) Az L1-es csigolya felemelt és megdöntött csigolyaíve. (D) A jobb oldali hemisekció, nagyítva a féloldalt átmetszett gerincvelő. Az ábrát Ángyán Gergely készítette.

3.10. Műtét utáni ápolás és nyomon követés

Az állatok a ketreceikben ébredtek fel a beavatkozást követően. Az állatokat melegen tartottuk infravörös lámpa segítségével, a hőmérséklet szabályozott helyiségben. Nem hagytuk magára a patkányokat az ébredést követően és nem eresztettük össze őket a többi patkánnyal.

Az ébredést követően 10 percen keresztül monitoroztuk a légzésüket, amíg teljesen magukhoz nem tértek. Amennyiben szükséges volt, enyhén stimuláltuk (például a fej dörzsölésével) az állatot, segítve a felébredésüket.

Amikor az állatok éber állapotba kerültek és kellően aktívak voltak, visszaszállítottuk őket az állatházba.

Az állatokat szoros megfigyelés alatt tartottuk a műtétet követő első 24 órán keresztül, majd az állatokat naponta kétszer ellenőriztük a vizsgálat végeztéig, figyelve a diszstressz jeleit.

Amennyiben diszstresszt fedeztünk fel valamely állatnál, az Anatómiai, Szövet- és Fejlesztési Intézet állat jólléti protokolljának megfelelően jártunk el. Az állatot a sebnek, a fertőzésnek, valamint a gyulladásnak megfelelő ellátásban részesítettük (a stressz és az infekció az állat jóllétét érintik, ami a vizsgálatból történő kizárásukhoz vezet).

A vizsgálat lezárultáig intramuszkuláris antibiotikum bevitel történt minden nap. Az állatokat steril ketrecekben tartottuk, egy ketrecben csak egy állat foglalt helyet. Az állatok vízzel és táplálékkal történő ellátása ad libitum történt. A vizsgálatok végeztével (vagy amennyiben kedvezőtlen reakciót tapasztaltunk a vizsgálat időtartama alatt) az állatok eutanáziáját humánus módon hajtottuk végre, az intézeti állat jólléti protokollnak megfelelően.

A gerincvelő sértéses modell része egy altatásban végzett egyszeri sebészeti beavatkozás. Ennek következtében kialakulhat fájdalom és fertőzés is. A patkányok esetében lehetséges fájdalom és stressz az USDA fájdalom és stressz kategóriák közül az E kategóriába tartozik.

Az állatok fájdalmának, stressz szintjének és diszkomfortérzetének felméréshez az alábbi paramétereket vizsgáltuk: az étvágy elvesztése, a testtömeg vesztese (maximum 20%), változás a természetes viselkedésben (az érdeklődés hiánya, kóros aluszékonyság, abnormális testtartások); inaktivitás; nyalogatás, rágcslás, vagy vakaródzás egy adott területen, vagy reszketés; abnormális válasz külső stimulusokra ; fizikai kinézet – az öntisztítás hiánya és ennek következményei az állat kinézetében (rendezetlen szőrzet); fájdalmas testrész védelme; a mobilitás elvesztése; vörös foltok az állat szemei körül; és végül a mérhető klinikai jelek – változás a testhőben, megnövekedett légzési ráta).

Az állatok eutanáziája (mély altatás mellett, melyet ketamine-xylazine kombinációval végeztünk) először fiziológiás sóoldat perfúziójával (1/3 ml/tsg) indult, melyet 4%-os paraformaldehid perfúziója követett (1 ml/tsg).

3.11. Metszetkészítés

A mintákat fixáltuk, dehidratáltuk és beágyasztuk parafinba, mielőtt mikrotóm segítségével metszeteket készítettünk. A metszeteket előkészítettük festéshez (rászárítás tárgylemezre, paraffin kioldás -xilolos, majd alkoholos, végül vizes kezeléssel). Hematoxin-eozin festést végeztünk a metszeteken, elsőként hematoxin festéssel, majd ellenfestés eozinnal. A metszett megfestését követően tartós preparátumot készítettünk, alkoholos víztelenítést és xilolos kezelést követően kanadabalzsamos kezelést végeztünk. Végül a metszeteket vékony fedőlemezzel fedtük (Röhlich 2006).

3.12. Statisztikai analízis

A statisztikai vizsgálat során IBM SPSS 27.0.1.0 programcsomagot használtunk. A vizsgálatok során variancia analízist (ANOVA) végeztünk.

4. Eredmények:

4.1. A glutation citokróm c általi oxidációjának jellemzése

Vizsgálataink során modelleztük a szabad, intermembrán térben elhelyezkedő citokróm c-t, ennek során nem alkalmaztunk foszfolipideket a vizsgálat során. A mitokondrium belső membránjához kötött citokróm c modellezését hozzáadott foszfolipidekkel végeztük. A vizsgálatok során megfigyeltük, melyik esetben növekszik meg a mitokondrium oxigén fogyasztása glutation mellett. Az oxigénfogyasztás változásából következtethetünk arra, hogy a glutation légzési szubsztrátként működik-e.

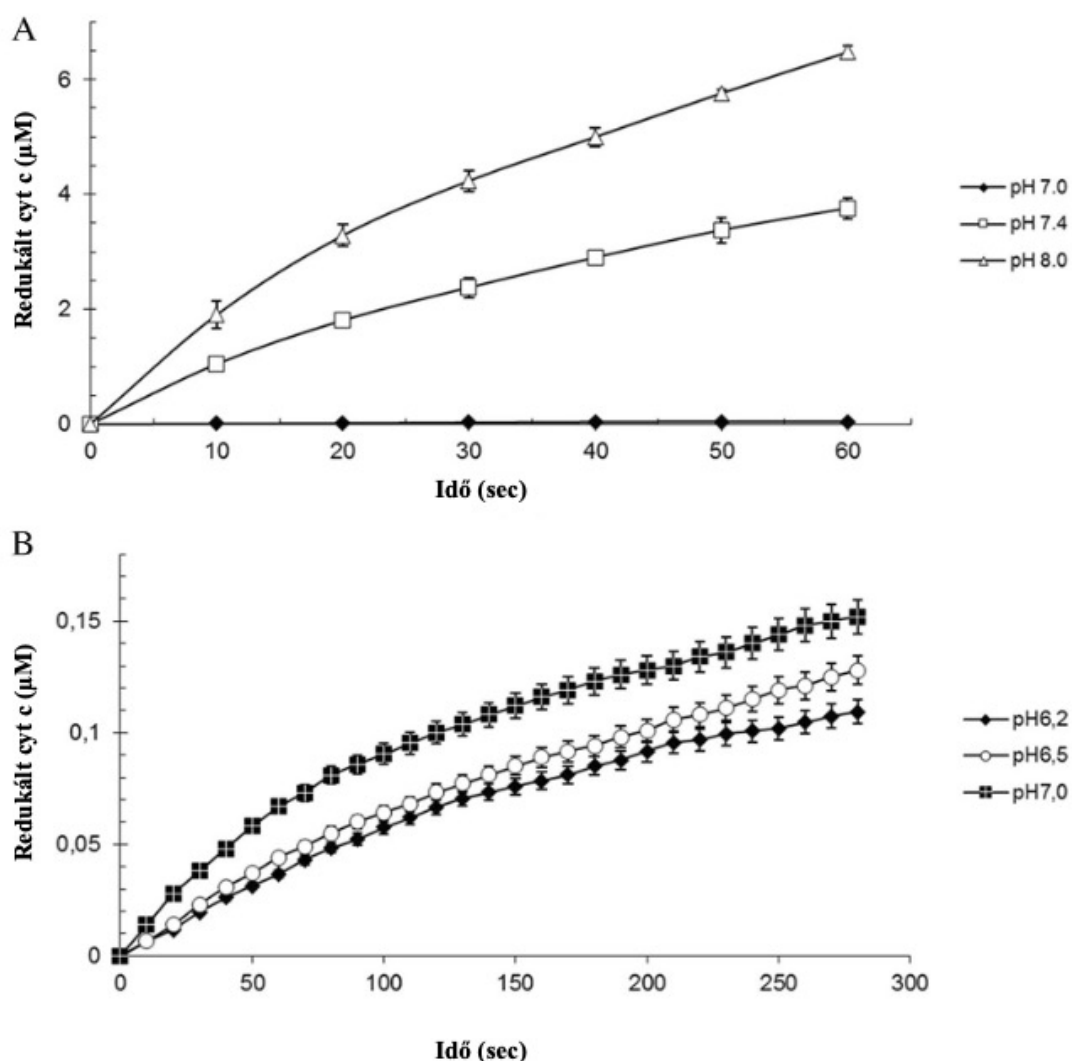
4.2. Szabad citokróm c (az intermembrán tér modellezése)

Korábbi vizsgálatok már bebizonyították, hogy a glutation képes a szabad citokróm c redukciójára (Hancock, Desikan et al. 2001). Ennek befolyásolhatóságát vizsgáltuk, a pH, a Ca^{2+} -, és a Mg^{2+} koncentráció változtatásának megfelelően.

4.2.1. A pH hatása a citokróm c redukcióra

Méréseink alapján a citokróm c redukciós rátája függ a pH-tól.

1 mM EDTA jelenlétében, 25 °C -on, a méréseket pH= 6,2; 6,5; és 7,0 (1. ábra B), valamint pH= 7,0; 7,4; és 8,0 (4. ábra B) mellett végeztük el. A mérések 300 másodpercig tartottak. A pH emelésével a citokróm c redukció megemelkedett glutation jelenlétében. A redukció mértékének növekedése folyamatos a pH emelkedésével és pH= 8,0 esetében érte el az általunk mért maximumot (4. ábra B) (Csomó, B et al. 2022).



4. ábra: A citokróm c redukció glutation jelenlétében különböző pH-n. (1 mM glutation, 1 mM EDTA jelenlétében, 25 °C-on. 1/A ábrán pH=7,0; 7,4; és 8,0 (40 mM Tris/HCl mellett) látható. 1/B ábrán pH=6,0; 6,5 (40 mM NaHCO₃ mellett); és 7,0 (40 mM Tris/HCl mellett); és 7,0 (40 mM Tris/HCl mellett) látható. A reakciók a citokróm c oldatokhoz történő hozzáadásával indultak.) (n = 6 ± SD)

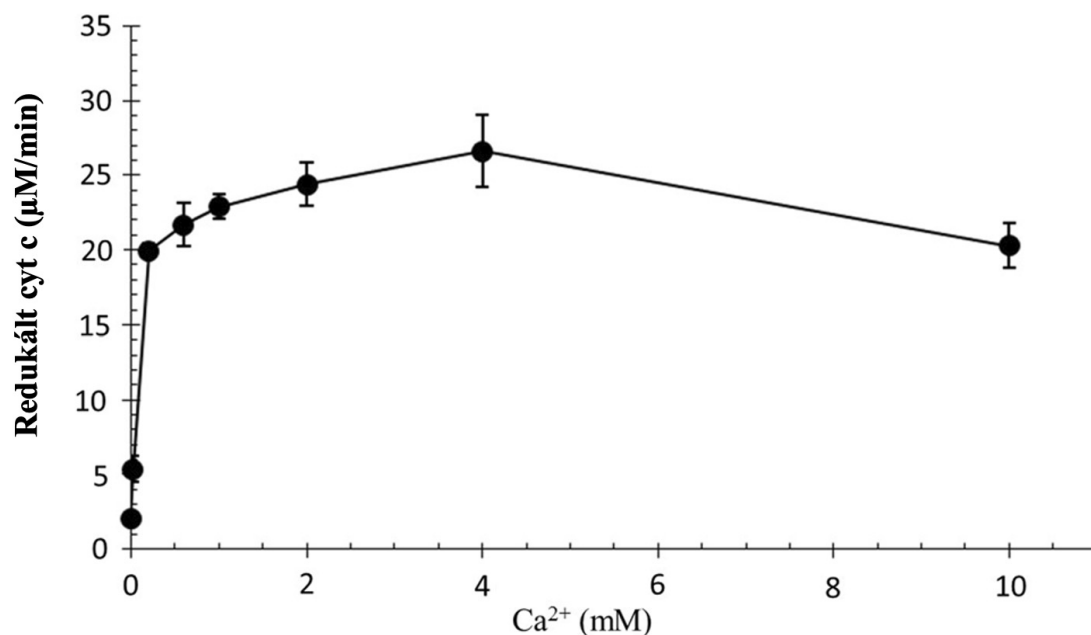
4.2.2. A Ca²⁺ koncentráció hatása citokróm c redukcióra

A Ca²⁺ úgy ismert, mint a légzési lánc enzimeinek (piruvát dehidrogenáz, ATP szintetáz, adenin nukleotid transzlokáz stb.) regulátora, melyeken keresztül a sejthalál feletti

kontrollban is szerepet játszik (Brookes, Yoon et al. 2004, Giacomello, Drago et al. 2007).

A mitokondriális Ca^{2+} szint emelkedése a citokróm c felszabadulásához vezet, amely az apoptózis elindításának kulcslépése lehet.

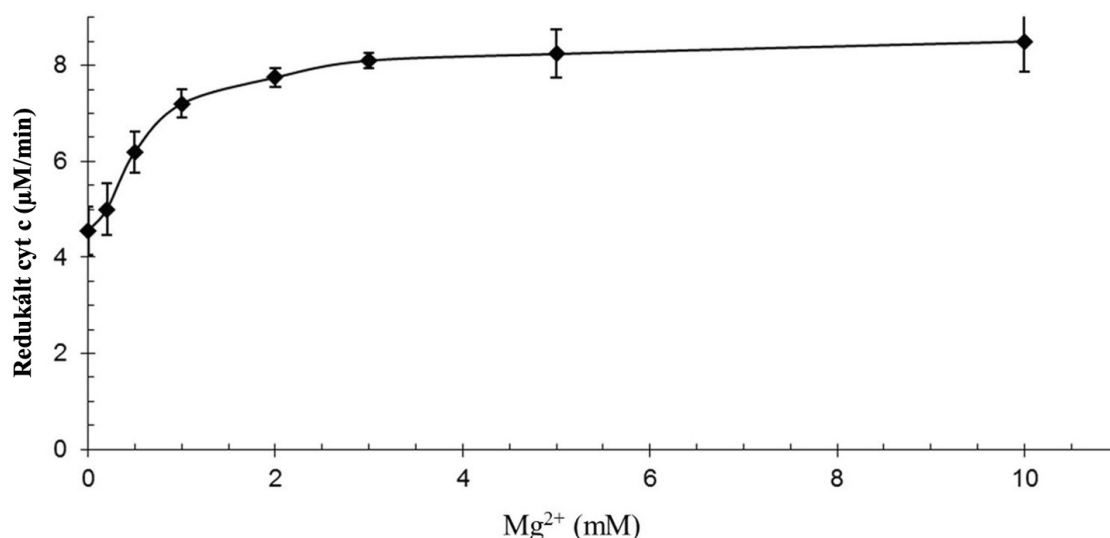
A méréseink szerint a glutation jelenlétében a szabad citokróm c redukció sebessége függ a Ca^{2+} koncentrációtól. A maximális redukciós ráta 1 mM és 4 mM Ca^{2+} koncentrációk között volt mérhető, viszont 10 mM Ca^{2+} koncentráció mellett már csökkent a redukció mértéke (5. ábra) (Csomó, B et al. 2022).



5. ábra: A citokróm c redukció glutation jelenlétében, különböző Ca^{2+} koncentrációk mellett. 100 μM szarvasmarha citokróm c, 1 mM glutation jelenlétében, 25 °C-on pH=8,0 (40 mM Tris/HCl) mellett. A méréseket 0-10 mM Ca^{2+} koncentráció tartományban végeztük. A reakciók a citokróm c oldatokhoz történő hozzáadásával indultak. ($n = 6 \pm \text{SD}$)

4.2.3. A Mg^{2+} koncentráció hatása a citokróm c redukcióra

A Mg^{2+} , mint bivalens kation szintén képes befolyásolni a citokróm c redukcióját. A citokróm c redukció sebessége a Mg^{2+} koncentráció függvényében változik. A maximális redukciós ráta 10 mM Mg^{2+} mellett volt mérhető (pH=8,0) (6. ábra) (Csomó, B et al. 2022).



6. ábra: A citokróm c redukció glutation jelenlétében, különböző Mg^{2+} koncentrációk mellett. 100 μM szarvasmarha citokróm c, 1 mM glutation jelenlétében, 25 °C-on, pH=8,0 (40 mM Tris/HCl) mellett. A méréseket 0-10 mM Mg^{2+} koncentráció tartományban végeztük. A reakciók a citokróm c oldatokhoz történő hozzáadásával indultak. ($n = 6 \pm SD$)

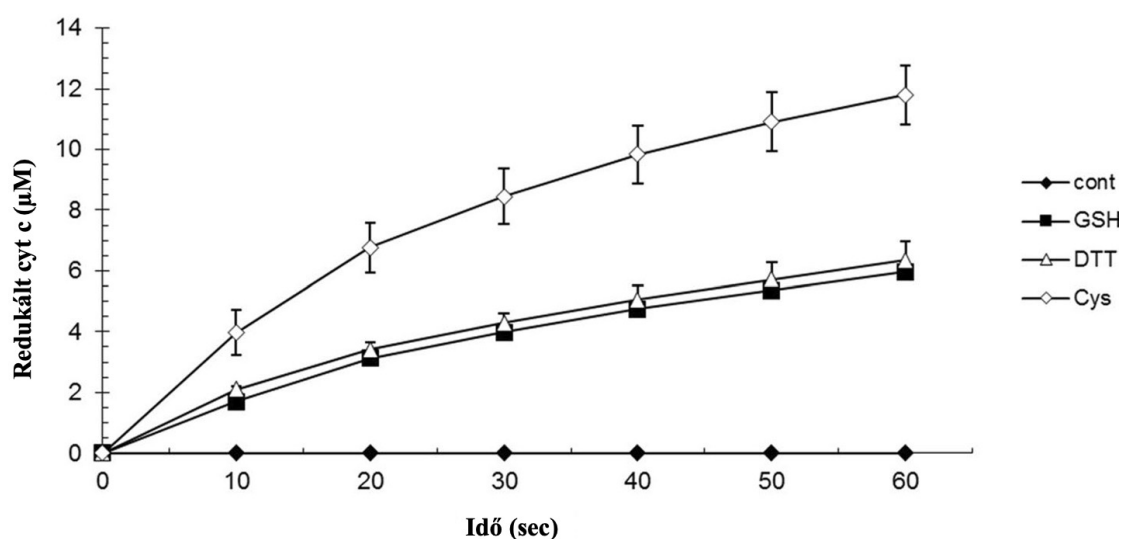
4.2.4. A NaCl hatása a citokróm c redukcióra

A bivalens kationok szerepének vizsgálata során a kísérleteket megismételtük azonos ionkoncentrációjú NaCl segítségével is (1,5 mM NaCl oldat ionerőssége ekvivalens 1 mM $CaCl_2$, illetve $MgCl_2$ oldattal). A NaCl nem okozott kimutatható változást a citokróm c redukcióban (Csomó, B et al. 2022).

4.2.5. Tiolok hatása a citokróm c redukcióra.

A tiolok közül a glutation van jelen a legnagyobb koncentrációban a sejtekben (Forman, Zhang et al. 2009). Megvizsgáltuk, hogy a cisztein és a ditiotreitol képes-e redukálni a citokróm c-t. Eredményeink alapján ugyanazon koncentrációban (1 mM) alkalmazva a három anyagot a cisztein esetében a citokróm c redukció körülbelül a kétszerese volt mind a ditiotreitolnak, mind a glutationnak. A méréseket pH=7,0, valamint pH=8,0

esetében is elvégeztük, 25 °C -on. A méréseink alapján végzett számítás szerint a cisztein : glutation arány, melyet a citokróm c redukciós ráták alapján számítottunk független volt a Ca^{2+} koncentrációtól, vagyis mindkét folyamatot hasonlóan befolyásolta a koncentráció változása (Csomó, B et al. 2022). A statisztikai vizsgálatok során Kruskal - Wallis próbát alkalmaztunk, mely szignifikáns különbséget mutatott, cisztein alkalmazása esetén szignifikánsan megnőtt a citokróm c redukciója, mind a ditioneitolhoz, mind a glutationhoz képest, a ditioneitol és a glutation között szignifikáns különbséget nem sikerült kimutatnunk (7. ábra).



7. ábra: Tiolok hatása a citokróm c redukcióra. 100 µM szarvasmarha citokróm c, 1 mM glutation (GSH), 0,5 mM (1 mM tiol) ditioneitol (DTT), valamint 1 mM cisztein (Cys) jelenlétében, 25 °C-on, pH=8,0 (40 mM Tris/HCl) mellett. A reakciók a citokróm c oldatokhoz történő hozzáadásával indultak. (n = 6 ± SD)

4.3. Kötött citokróm c (az intermembrán kötött citokróm c modellezése)

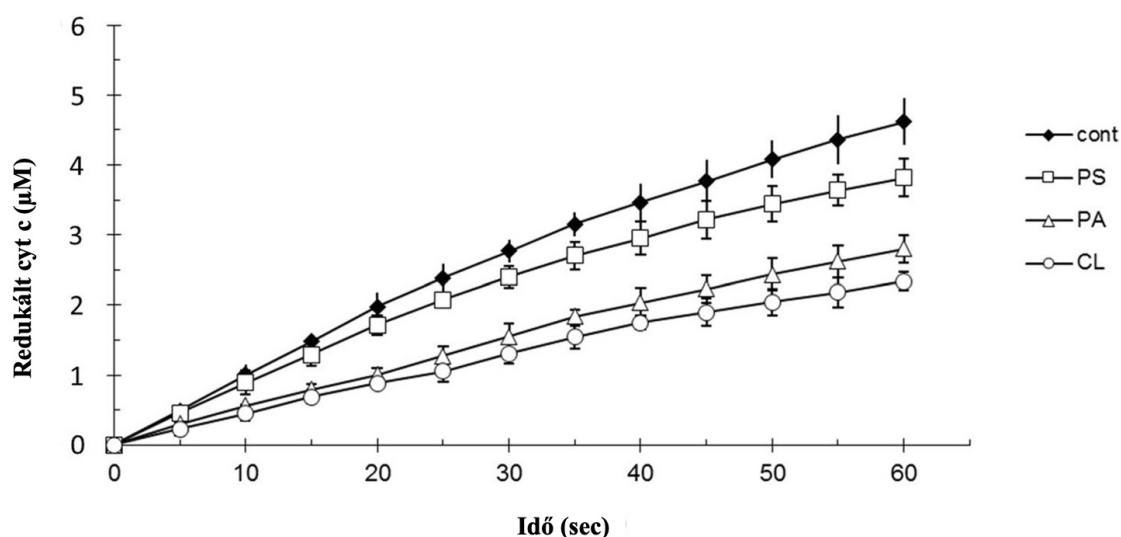
Fiziológiás körülmények között a citokróm c nem redukálódik a glutation hatására. Ezen körülmények vizsgálatához a citokróm c-hez kardiolipint adtunk, a kardiolipinhez kötött citokróm c alkalmas a membránhoz kötött citokróm c in vitro modellezésére.

4.3.1. Negatív töltésű foszfolipidek hatása a citokróm c redukcióra

Glutation jelenlétében a szabad citokróm c redukció leggyorsabban pH=8,0 esetén ment végbe. Ezért vizsgálatainkat pH=8,0 mellett végeztük el.

Az anionos foszfolipidek (foszfatidsav (PA), foszfatidil-szerin (PS), kardiolipin (CL)) csökkentették a citokróm c redukciós rátáját. Az inhibitor hatás koncentrációfüggő módon változott, egyenes arányú összefüggést mutatva.

A foszfatidil-szerin mutatta a legkisebb gátló hatást, míg a kardiolipin a legerősebbet, 250 µg/ml foszfolipid koncentráció mellett (8. ábra). (Csomó, B et al. 2022)

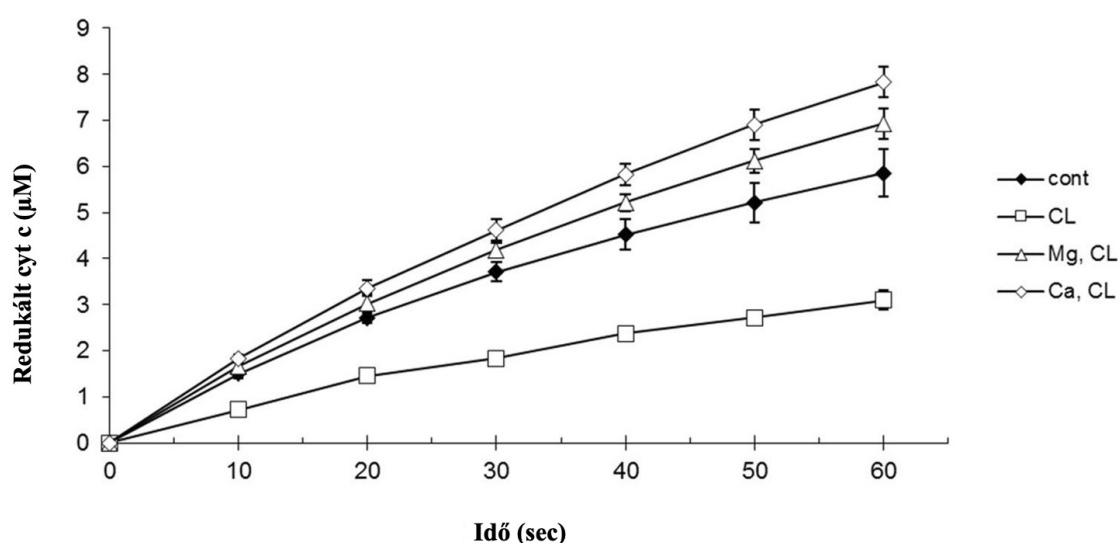


8. ábra: Foszfolipidek hatása a citokróm c redukcióra, glutation jelenlétében. 100 µM szarvasmarha citokróm c, 1 mM glutation, 0,1 mM EDTA, 5 v/v% etanol (foszfolipid oldószer), 25 °C-on, pH=8,0 (40 mM Tris/HCl) mellett. 250 µg/ml foszfatid sav (PA), 250 µg/ml foszfatidil szerin (PS), 250 µg/ml kardiolipin (CL) jelenlétében. A reakciók a citokróm c oldatokhoz történő hozzáadásával indultak. (n = 6 ± SD)

4.3.2. Ca^{2+} , Mg^{2+} és NaCl hatása a citokróm c redukcióra, foszfolipid jelenlétében

250 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációban alkalmaztunk kardiolipint a membránkött citokróm c modellezéséhez. A kísérletek során 1 mM Ca^{2+} , illetve 1 mM Mg^{2+} növelte a citokróm c redukciós rátáját. Ezek alapján elmondható, hogy az anionos foszfolipid inhibitor hatása mérséklődik bivalens kationok (Ca^{2+} , Mg^{2+}) jelenlétében.

Azonos ionerősségben (1,5 mM) alkalmazott NaCl nem befolyásolta a citokróm c glutation általi redukcióját 250 $\mu\text{g/ml}$ kardiolipin koncentráció mellett (9. ábra). (Csomó, B et al. 2022)



9. ábra: Mg^{2+} és Ca^{2+} és foszfolipidek hatása a citokróm c redukcióra, glutation jelenlétében. 100 μM szarvasmarha citokróm c, 1 mM glutation, 5 v/v% etanol (foszfolipid oldószer), 25 °C-on, pH=8,0 (40 mM Tris/HCl) mellett. 250 $\mu\text{g/ml}$ kardiolipin (CL), 250 $\mu\text{g/ml}$ kardiolipin és 1 mM Ca^{2+} (Ca, CL), 250 $\mu\text{g/ml}$ kardiolipin és 1 mM Mg^{2+} (Mg, CL), kontroll (kardiolipin, illetve Mg^{2+} és Ca^{2+} nélkül) (cont) jelenlétében. A reakciók a citokróm c oldatokhoz történő hozzáadásával indultak. (n = 6 $\pm$ SD)

4.4. Glutacion, mint mitokondriális légzési szubsztrát

A patkány máj mitokondrium képes a glutacion légzési szubsztrátként történő használatára (Marí, de Gregorio et al. 2020). A glutacion nem változtat a patkány máj

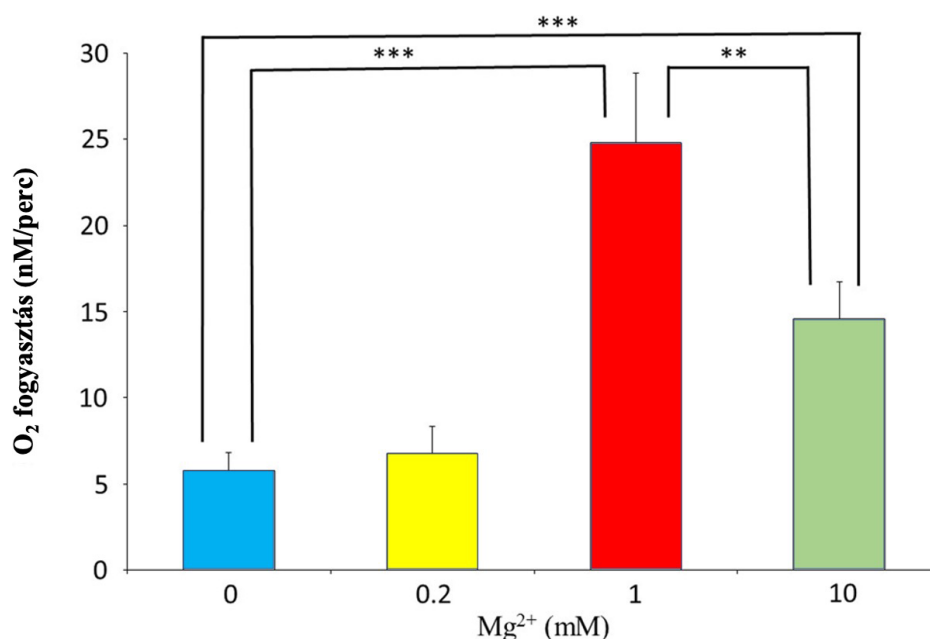
mitokondrium alap O_2 fogyasztásán pH= 7,0 és 1 mM EDTA koncentráció mellett, amennyiben nincsen jelen hozzáadott Mg^{2+} , vagy Ca^{2+} .

A patkány máj mitokondrium O_2 fogyasztása pH=8,0 és 5 mM glutation koncentrációnál emelkedik.

A Mg^{2+} emeli az oxigén fogyasztást, koncentrációfüggő módon, a hatásmaximumot 1 mM Mg^{2+} koncentráció mellett mértük (10. ábra).

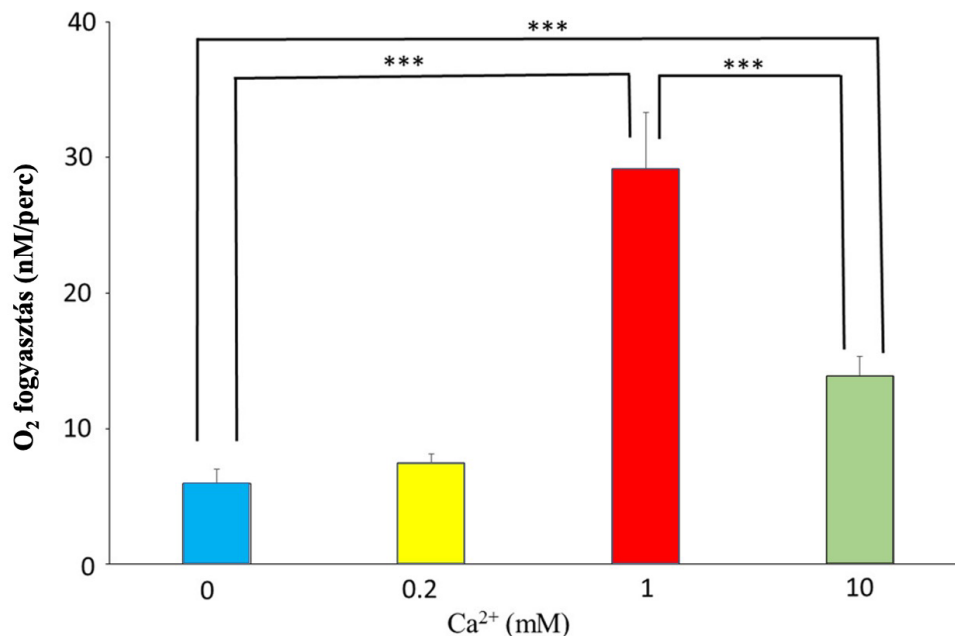
Az O_2 fogyasztást csak ADP jelenlétében (333 μ M) mértünk (Jeneson, Schmitz et al. 2009). ADP hiányában a mitokondriális O_2 fogyasztás Mg^{2+} jelenlétében nem változik. A Ca^{2+} hasonló hatást vált ki, mint a Mg^{2+} . 333 μ M ADP jelenlétében 1 mM Ca^{2+} szignifikánsan ($p<0,001$) növeli az O_2 fogyasztást, viszont 10 mM koncentráció mellett a Ca^{2+} csökkenti az O_2 fogyasztást. (11. ábra)

A méréseket megismételve mitokondrium nélkül, a glutation nem eredményezett O_2 fogyasztást (Csomó, B et al. 2022).



10. ábra: A Mg^{2+} hatása a mitokondriális oxigénfogyasztásra. 100 μ M szarvasmarha citokróma, 80 mM KCl; 20 mM TRIS/HCl; 0,1 mM EGTA; 10 mM KH_2PO_4 ; pH 8.0 mellett; 37 °C-on; 5 mM GSH jelenlétében; 1 mg mitokondriális fehérje/ml.

Alkalmazott Mg^{2+} koncentrációk: 0,2 mM, 1 mM, 10 mM. A ** közepes szignifikáns különbséget ($p<0,01$), a *** erősen szignifikáns különbséget ($p<0,001$) jelez.



11. ábra: A Ca²⁺ hatása a mitokondriális oxigénfogyasztásra. 100 µM szarvasmarha citokróm c, 80 mM KCl; 20 mM TRIS/HCl; 0,1 mM EGTA; 10 mM KH₂PO₄; pH 8.0 mellett; 37 °C-on; 5 mM GSH jelenlétében; 1 mg mitokondriális fehérje/ml. Alkalmazott Ca²⁺ koncentrációk: 0,2 mM, 1 mM, 10 mM. A *** erősen szignifikáns különbséget (p<0,001) jelez.

4.5. A pravastatin és a simvastatin hatása a citokróm c redukcióra

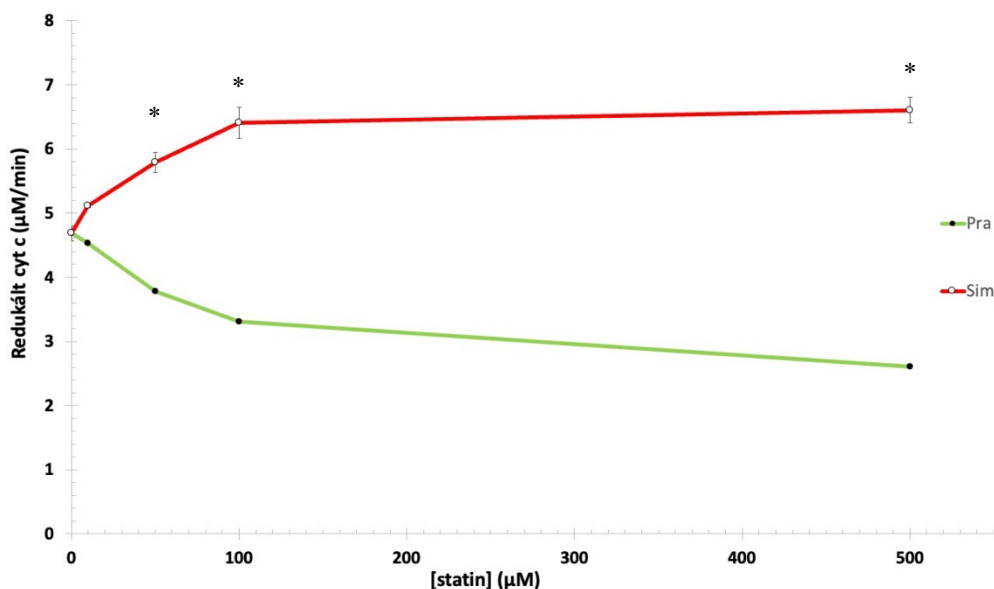
Ugyanazon körülmények között (pH = 8,0; 1 mM EDTA; hozzáadott Mg²⁺, vagy Ca²⁺ nélkül) a simvastatin növelte a citokróm c redukciós sebességét, míg a pravastatin csökkentette a redukció sebességét, 1 mM glutation mellett.

A lipofil (simvastatin) és a hidrofil (pravastatin) mitokondriális légzésre kifejtett hatása ellenkező.

A hatás mindkét esetben koncentrációfüggést mutat. Vizsgálataink azt mutatták, hogy 100 µM pravastatin 27 %-os csökkenést, míg 100 µM simvastatin 36 %-os emelkedést okozott a citokróm c redukció sebességében (12. ábra).

A statisztikai analízis alapján, melynek során Kruskal-Wallis tesztet alkalmaztunk, a független változók vizsgálatára elmondhatjuk, hogy ugyanazon koncentrációkban alkalmazott simvastatin és pravastatin esetében szignifikáns különbséget tudtunk

kimutatni. A vizsgálat post hoc elemzése során, melyre Games-Howell tesztet alkalmaztunk, a szignifikáns különbségek 50 μM , 100 μM , 500 μM koncentrációknál jelentkeztek (Csomó, Belik et al. 2022).



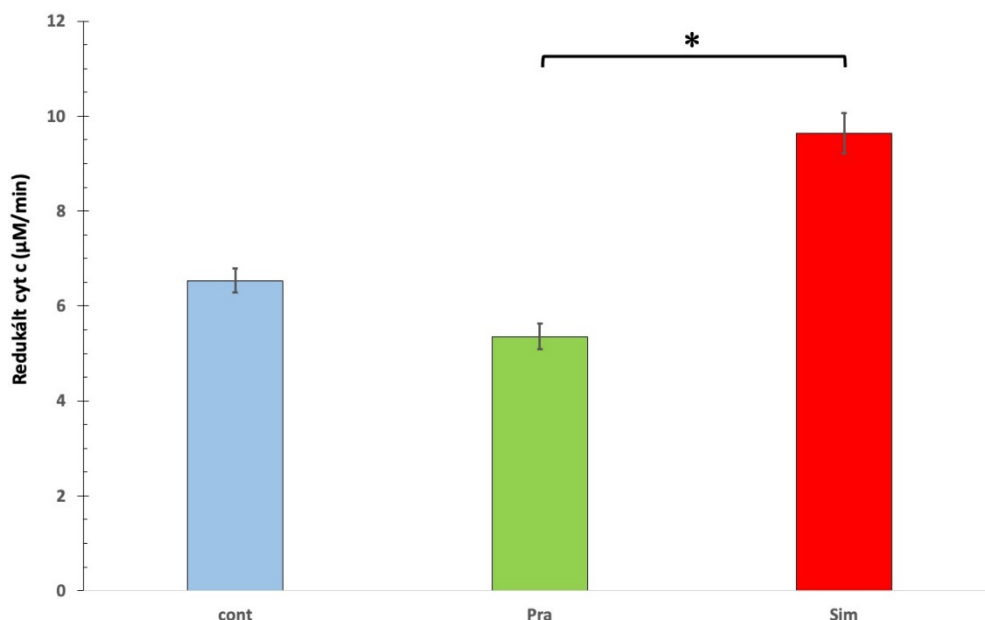
12. ábra: A pravastatin és a simvastatin hatása a citokróm c redukcióra. 100 μM szarvasmarha citokróm c, 1 mM EDTA, 1 mM glutation, 100 mM Tris/HCl (pH=8,0), 25 °C-on. A mérések szignifikáns különbséget ($p < 0,05$) mutatnak. A * szignifikáns különbséget ($p < 0,05$) jelez.

4.5.1. Mg^{2+} hatása a pravastatin és a simvastatin által módosított citokróm c redukcióra

Mg^{2+} jelenlétében mind a 100 μM pravastatin, mind a 100 μM simvastatin hatása mellett a citokróm c redukció sebessége növekedést mutatott a Mg^{2+} nélküli vizsgálathoz képest, pH = 8,0 mellett. Pravastatin és az 1 mM koncentrációban alkalmazott Mg^{2+} a citokróm c redukcióját 17 %-kal csökkentette (a Mg^{2+} nélküli vizsgálat esetén mért 27 % volt a csökkenés mértéke). A simvastatin okozta citokróm c redukció emelkedés 1 mM Mg^{2+} jelenlétében további, kismértékű növekedést mutatott.

A két hatás esetében mért különbség szignifikánsnak adódott, Kruskal-Wallis tesztet alkalmazva ($p = 0,007$), Games-Howell post hoc teszt alapján a szignifikáns különbség a

pravastatin és a simvastatin mellett mért eredmények között mutatkozott (Csomó, Belik et al. 2022) (13. ábra).



13. ábra: A pravastatin és a simvastatin hatása a citokróm c redukcióra, Mg^{2+} jelenlétében. 100 μM szarvasmarha citokróm c, 1 mM glutation, 1 mM Mg^{2+} , 100 mM Tris/HCl (pH=8,0), 25 °C-on. Cont: kontroll pravastatin és simvastatin nélkül; Pra: 100 μM pravastatin; Sim: 100 μM simvastatin. A * szignifikáns különbséget ($p < 0,05$) jelez.

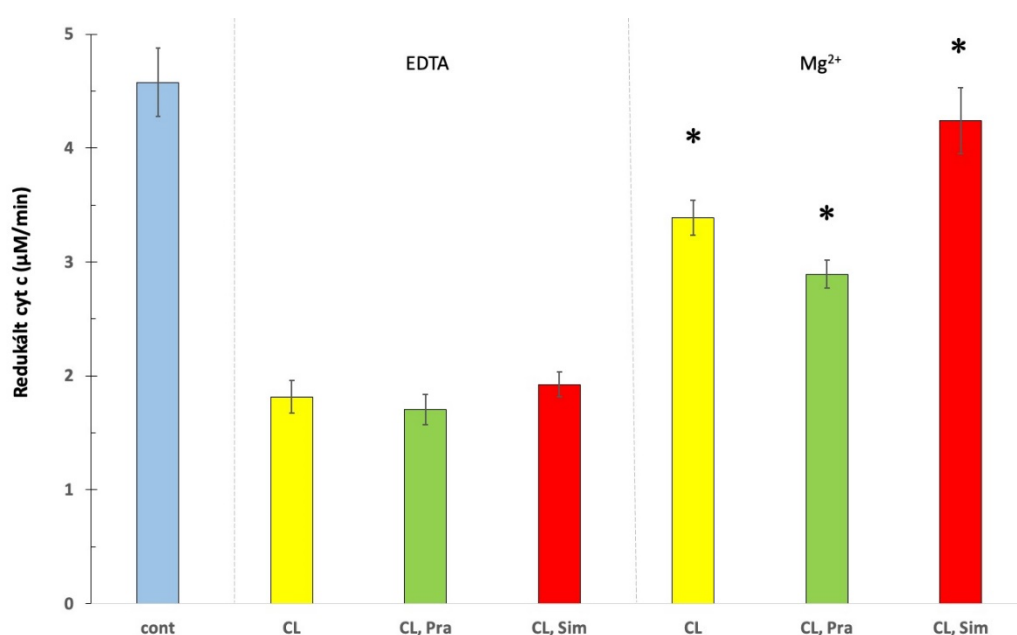
4.5.2. Kardiolipin hatása a pravastatin és a simvastatin által módosított citokróm c redukcióra

200 μg/ml koncentrációjú kardiolipin jelenlétében a citokróm c glutation oxidáló kapacitása redukálódott. A hozzáadott 100 μM pravastatin, vagy a 100 μM simvastatin nem okozott szignifikáns különbséget a citokróm c redukciójának sebességében. (Csomó, Belik et al. 2022) (14. ábra)

4.5.3. Mg^{2+} , valamint kardiolipin együttes alkalmazásának hatása a pravastatin és a simvastatin által módosított citokróm c redukcióra

Amennyiben a kísérlet során egyszerre alkalmaztunk 1,0 mM Mg^{2+} -t, és 200 μ g/ml kardiolipint, a redukció növekedését tapasztaltunk a citokróm c esetében, glutation jelenlétében, mely szignifikáns volt ($p < 0,05$). Ennek magyarázatául szolgálhat, hogy a Mg^{2+} mind a kardiolipinhez, mind a citokróm c-hez képes kötődni (Elmer-Dixon, Xie et al. 2020).

Amennyiben 100 μ M pravastatint is alkalmazunk (a Mg és kardiolipin mellett), úgy a glutation oxidációja 15%-os csökkenést mutat. 100 μ M simvastatin jelenlétében viszont 24%-os növekedést mutat. (Csomó, Belik et al. 2022) (14. ábra)

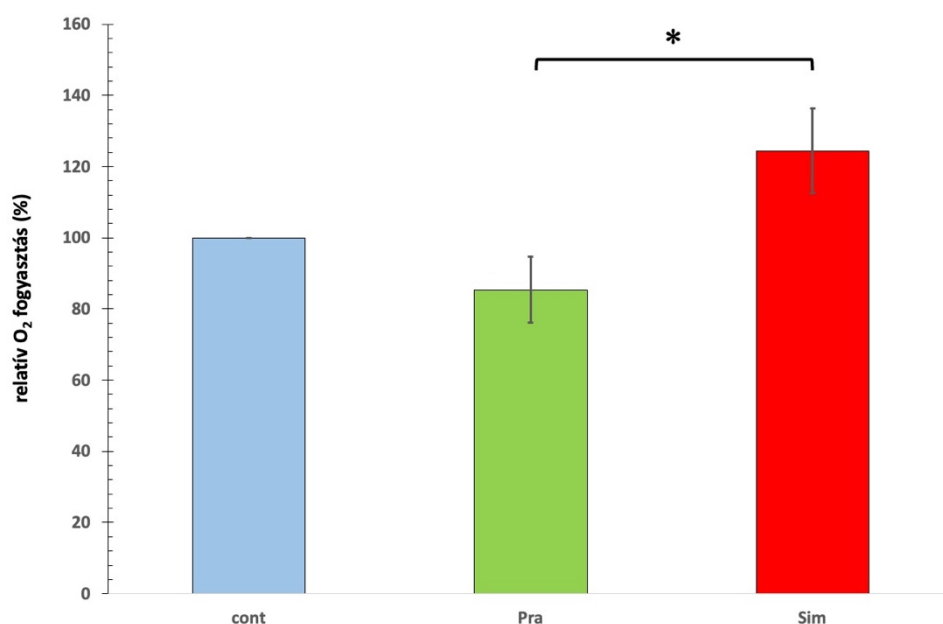


14. ábra: A pravastatin és a simvastatin hatása a citokróm c redukcióra, kardiolipin jelenlétében, Mg^{2+} nélkül és 1mM Mg^{2+} jelenlétében. 100 μ M szarvasmarha citokróm c, 100 mM Tris/HCl (pH=8,0), 1mM Mg^{2+} (Mg), 1mM EDTA (EDTA). Cont: kontroll pravastatin és simvastatin nélkül; CL: 200 μ g/ml kardiolipin; CL, Pra: 200 μ g/ml kardiolipin, 100 μ M pravastatin; CL, Sim: 200 μ g/ml kardiolipin, 100 μ M simvastatin. A * szignifikáns különbséget ($p < 0,05$) jelez.

4.6. A pravastatin és a simvastatin hatása a patkány máj mitokondrium oxigén fogyasztására.

1 mM Mg^{2+} jelenlétében a mitokondriális oxigénfogyasztás csökkent 12 %-kal, amennyiben 100 μM pravastatint használtunk, viszont 100 μM simvastatin alkalmazása mellett az O_2 fogyasztás 22 %-kal emelkedett. (Csomó, Belik et al. 2022) (15. ábra)

A simvastatin és a pravastatin ellentétes hatásának eredményeit Kruskal-Wallis teszttel vizsgáltuk, mely szignifikáns különbséget mutatott ki ($p=0,024$), a post hoc vizsgálat során Games-Howell tesztet alkalmazva a pravastatin és a simvastatin hatása közötti különbség mutatkozott szignifikánsnak. (Csomó, Belik et al. 2022).



15. ábra: A pravastatin és simvastatin hatása a mitokondriális oxigénfogyasztásra. 1 mM Mg^{2+} ; pH 8.0 mellett; 37 °C-on; 1 mM GSH jelenlétében; 1 mg mitokondriális fehérje/ml. Pra: 100 μM pravastatin; Sim: 100 μM simvastatin. A csillag szignifikáns különbséget ($p<0,05$) jelez.

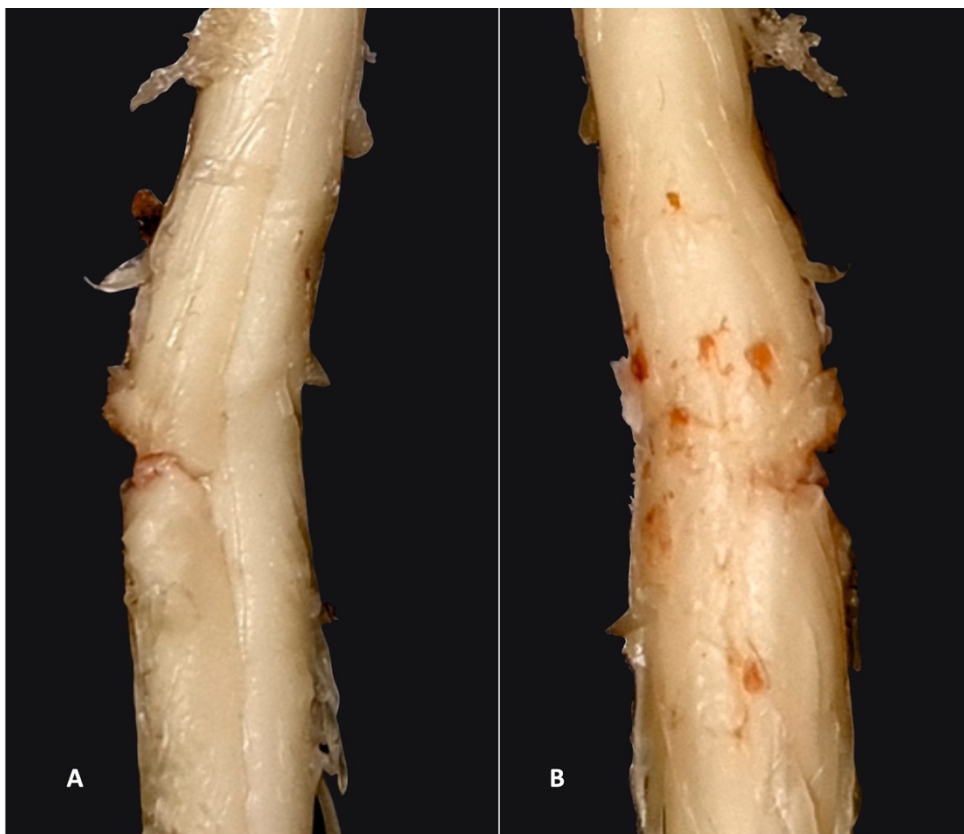
4.7. Az eltávolított gerincvelő értékelése

A féloldali átmetszést követően a patkányok az azonos oldali hátsó végtagjuk esetében bénulást mutattak (in vivo ez a sikeres hemisekció jele). A vizsgálati minta alapos vizsgálata csak a gerincvelő eltávolítását követően valósulhat meg (a 16. ábrán látható az eltávolított gerincvelő mind dorsalis, mind ventralis oldalról)

Az eltávolított gerincvelőt mikroszkóp alatt vizsgáltuk meg (4x-16x nagyítás mellett), hogy megállapíthassuk a sértés szögét és pontosságát. Ezt követően a mintákat szövettani vizsgálat alá vetettük, ahol a sértés kivitelezését alaposan megvizsgálhattuk. Hematoxilin és eozin (H&E) festést alkalmaztunk.

A 16-os és 17-es ábrák mutatják, hogy a bemetszés tökéletesen megfelel mind hosszban, mind helyzetében. A minták minősége legalább olyan jó volt, mint azoknál az állatoknál, ahol a hagyományos technikát alkalmaztuk laminektómia mellett. A felvételeken látható, hogy az eredmények nem különböznek minőségileg más sebészi módszerrel végzett beavatkozásoktól, viszont ez a módszer gyorsabban kivitelezhető, és nem szükséges laminektómia.

Az eredmények azt mutatják, hogy ez a technika sokkal gyorsabban kivitelezhető, mint a hagyományos, amely laminektómiát alkalmaz (11 perc, szemben 35 perccel). A gerincvelő mindössze 10-15 másodpercet van nyitva, a laminektómia melletti minimum 3,5 perccel szemben (a dura zárásáig számítva). Így összességében a minimál invazív gerincvelő sértéses módszer laminektómia nélkül sokkal gyorsabb és nem igényel a klasszikus módszerhez képest új eszközt vagy anyagot.



16. ábra: Az eltávolított, hemiszekción átesett gerincvelő ventralis és dorsalis nézete.
Az egészben eltávolított gerincvelő ventralis (A) és dorsalis nézete (B).



17. ábra: Hemiszekció szövettani minta. A hisztológiai minta hematoxilin eozinnal festve, a féloldali átmetszést mutatja, 16x nagyítású felvétel. 1 mm-es lépték jelezve.

5. Megbeszélés

Vizsgálataink során elsőként jellemeztük a citokróm c glutation általi redukcióját, in vitro körülmények között. A mitokondriummal végzett kísérletek során az O_2 fogyasztást közvetlenül mértük, így a citokróm c membrántól történő disszociációja és a redukció nem volt közvetlenül vizsgálható. A 18. ábrán látható hipotéziseink az in vitro vizsgálatainkon alapulnak, melynél a citokróm c mind szabad, mind membránkötött formában előfordulhat.

5.5. Metodikai szempont a reaktív oxigén gyökök képződésének értékelése szempontjából

A vizsgálatainknak metodikai szempontjai is vannak. A citokróm c szabad formában szuperoxid dizmutázként is működhet, ennek során reaktív oxigén gyökök O_2 -é történő alakítását hajtja végre, vagyis a mérés specificitását újra definiálni kell. Ugyanis, amennyiben a citokróm c redukciót mérjük, az a citokróm c szuperoxid dizmutáz aktivitását is méri (ennek az aránynak a meghatározásához az enzim által termelt szuperoxid mennyiségi meghatározására lenne szükség). Mindez fontos lehet, ugyanis a praeeclampsziában szenvedők placentája különböző reaktív oxigént tartalmazó molekulákat képezhet (Kukor and Valent 2010). Ennek alapja, hogy a tetrahydrobiopterin koncentrációjától függő módon (Sahin-Tóth, Kukor et al. 1997, Tóth, Kukor et al. 1997), az eNOS dimerizáció következik be és így NO-t, vagy szuperoxidot termel. Így a ROS mérés esetén alkalmazott módszer, mely a citokróm c redukciójának mérésén alapul (Lampé 2012), megkérdőjelezhető.

Mivel a ditiotreitől jelenlétében 1 mM Ca^{2+} , 1 mM Mg^{2+} szükséges az eNOS aktivitáshoz (Kukor and Tóth 1994), és eredményeink alapján ilyen körülmények között a citokróm c redukció működött és független volt a Ca^{2+} koncentrációtól. Ebből arra a következtetésre juthatunk, hogy a placenta szuperoxid termelése nem mérhető a citokróm c redukció alapján, ugyanis a citokróm c ditiotreitől általi redukciójának mértéke nem szűrhető ki, amely viszont a mérést értékelhetetlenné teszi.

5.6. Ca^{2+} és Mg^{2+} hatása a citokróm c felszabadulásra és aktivációjára

Vizsgálataink alapján elmondható, hogy foszfolipidek jelenlétében, de Ca^{2+} és Mg^{2+} hiányában a glutation nem redukálja a citokróm c-t., valamint a glutation általi citokróm c redukciót a legerősebben a kardiolipin gátolta. A gátló hatásnak több oka is van. Egyrészt a bivalens kationok képesek a citokróm c disszociációját elősegíteni a foszfolipidekről (Gerencsér, Laczkó et al. 1999). Másrészt, méréseink szerint a bivalens kationok (amennyiben foszfolipid nincsen jelen) képesek a szabad citokróm c redukcióját gyorsítani. Mindezek azt sugallják, hogy a Ca^{2+} és a Mg^{2+} képesek közvetlenül befolyásolni a citokróm c működését.

5.7. A glutation, mint a mitokondriális légzési lánc szubsztrátja

Eredményeink megmutatják, hogy a mitokondrium glutationt használhat légzési szubsztrátként magas pH mellett, Ca^{2+} és Mg^{2+} ionok jelenlétében. Viszont pH = 7,0 mellett, EDTA jelenlétében a glutation nem okozza a mitokondrium oxigén-fogyasztásának emelkedését. Az in vitro vizsgálataink bebizonyították, hogy kardiolipinhez kötötten a citokróm c nem képes a glutation oxidációjára, viszont Ca^{2+} és Mg^{2+} jelenlétében a glutation oxidációja megindul.

Ezek alapján az in vitro és in vivo vizsgálatok azt mutatják, hogy a glutation a mitokondriális légzési lánc szubsztrátja lehet, amennyiben a citokróm c disszociált a mitokondrium belső membránjától.

5.8. A citokróm c redukciós képessége glutation jelenlétében, a Mg^{2+} koncentráció változásának függvényében.

ADP jelenléte nélkül a Mg^{2+} nem okozta a mitokondriális oxigén fogyasztás emelkedését. Ez azt a feltételezést erősíti meg, hogy az általunk vizsgált oxigén fogyasztás a mitokondriális légzési lánchoz (melynek része a citokróm c fehérje is) kötött. In vitro és in vivo méréseink alapján, a Mg^{2+} koncentrációjának emelése az O_2 fogyasztás növekedéséhez vezetett. Ennek hátterében az áll, hogy a korábban leírtaknak

megfelelően, a Mg^{2+} a citokróm c, foszfolipidektől történő leválását, valamint az emelkedett Mg^{2+} koncentráció a citokróm c redukciójának sebességét is emeli.

Mivel a citokróm c magas koncentrációban van jelen az intakt mitokondrium intermembrán terében (0,7 mM -os koncentrációig), fiziológias ionerősség mellett (Hackenbrock, Chazotte et al. 1986), ez a folyamat jelentős változást okozhat a mitokondriális oxigénfogyasztásban.

A vizsgálataink magyarázatot adnak arra, hogy a citokróm c miért nem oxidálja a glutationt alacsony Mg^{2+} koncentráció mellett. Ennek hátterében a citokróm c membránhoz való kötöttsége áll, melyet kardiolipinnel modelleztünk. Membránkötött formában a citokróm c a légzési lánc részeként működik, nem tud a glutationnal kapcsolatba lépni, így nem emelkedik az oxigén fogyasztás.

Eredményeink alapján elmondható, hogy magasabb Mg^{2+} koncentráció (1 mM-tól) mellett a citokróm c leválik a membránról, ami lehetővé teszi a glutation oxidációját. A citokróm c az intermembrán térben marad és a belső membránhoz kötődhet és az elektron az O_2 -hez szállíthat. Számos közlemény írja le, hogy a citokróm c beléphet az intermembrán térbe a belső membránról, redukálódhat, majd újra a belső membránhoz kötődhet, ahol a citokróm c oxidáz által oxidálódik. Ennek a ciklusnak megvannak a fiziológiai feltételei, melyeknek része a diszulfid kötések létrejötte a fehérjékben (Cortese, Voglino et al. 1998, Endo, Yamano et al. 2010).

A magasabb Mg^{2+} koncentráció mellett (10 mM), a citokróm c kiszabadulhat a mitokondriumból (Eskes, Antonsson et al. 1998), és többet nem képes visszatérni az intermembrán térbe. Ez mérsékeli a mitokondrium O_2 fogyasztását az 1 mM-os Mg^{2+} koncentrációhoz képest, de az intermembrán térben jelen lévő citokróm c továbbra is biztosítja a glutation oxidációját, ezáltal kisebb mértékben, de a mitokondriális oxigénfogyasztás továbbra is emelkedett marad.

5.9. A citokróm c redukciós képessége glutation jelenlétében, a Ca^{2+} koncentráció változásának függvényében.

A Mg^{2+} -nak megfelelően magyarázható a Ca^{2+} hatása is. Eredményeink szerint felvethetjük, hogy a bivalens kationok a citokróm c működésére hasonló hatással vannak.

5.10. A citokróm c redox tulajdonságai fiziológiai körülmények között.

A citokróm c kardiolipinhez történő kötése változásokat idéz elő a citokróm c redox tulajdonságaiban (Kagan, Borisenko et al. 2004). Például a kardiolipinhez kötött citokróm c nem képes a $O_2^{\cdot-}$ -t O_2 -é alakítani. Az anionikus lipidhez történő kötődés akadályozza a szulfhidril csoportról történő elektron transzfert a citokróm c-re. Ez a magyarázata annak, hogy a citokróm c membránkötött állapotban nem képes oxidálni a glutationt. Ez energia megtakarítást okoz, ugyanis a NADH-tól érkező elektron az elektron transzfer lánchoz az I. komplexen keresztül érkezik, míg a szulfhidril csoporttól érkező elektron a IV-es komplexen keresztül lép be. Ezt a vizsgálataink is megerősítik.

5.11. A citokróm c, valamint a glutation szerepe az apoptózis folyamatában

A sejt intracelluláris környezetében történő változások, mint például változás a redox környezetben, fontos szabályozói az apoptózis megindításának (Pervaiz and Clément 2002). A glutation koncentrációjának csökkenése az apoptotikus folyamatok megindulásának egyik korai jele, számos sejttípusban (Circu and Aw 2008, Circu and Aw 2012, Circu and Aw 2012).

A belső mitokondriális apoptotikus út oxidatív stressz által is aktiválódhat. Különböző apoptotikus stimulusok (például a reaktív oxigén gyökök) indíthatják meg a mitokondrium külső membrán áteresztőképességének növekedését, amely a proapoptotikus proteinek (citokróm c, Apaf-1, endonukleáz G, stb.) felszabadulásához vezet (Circu and Aw 2012).

Eredményeink alapján feltételezzük, hogy a citokróm c intermembrán térbe jutása gyorsan csökkenti a glutation szintjét a mitokondrium intermembrán terében, annak oxidációja révén. Fiziológiai körülmények között az intermembrán térben a citokróm c koncentráció összehasonlítható nagyságrendben található a glutation koncentrációjával (0,5-1,0 mM) (Bayir, Fadeel et al. 2006). Vizsgálataink során igazoltuk, hogy a mitokondriális oxigén fogyasztás megemelkedik 1 mM glutation, valamint 1 mM Mg^{2+} jelenlétében, pH = 8,0 mellett, így a lezajló redox folyamatoknak megfelelően a redukált citokróm c újból oxidálódik az oxigén segítségével. A glutation koncentrációja

jelentősen csökken, amely az apoptózis szempontjából is jelentőséggel bírhat. Továbbá igazoltuk, hogy a bivalens kationok (Ca^{2+} és Mg^{2+}) koncentrációjának nagymértékű emelkedése (10 mM) a mitokondrium oxigénfogyasztásának relatív (1 mM-hoz képest) csökkenését okozza, amelyet a mitokondriumból történő citokróm c kiáramlás magyarázhat. Ez a mitokondriális citokróm c kiáramlás szintén jelentős tényező lehet az apoptózis megindításában, továbbá magyarázhatja egy oldalról a glutation koncentráció-csökkenés szerepét is az apoptózisban, mint a citokróm c felszabadulásának velejáróját.

A glutation apoptotikus szerepét tovább árnyalhatjuk.

Több vizsgálat állítja, hogy a mitokondriális glutation szint csökkenése nem csak az apoptózis megindulásának jele, de fontos tényező is a sejthalál kaszkádjában (Brookes, Yoon et al. 2004, Lash 2006, Circu and Aw 2012). Úgy tűnik, hogy a glutation oxidációja fontos szerepet játszik a PTP nyitásában, ezzel is hozzájárulva a citokróm c mitokondriumból történő kiszabadulásához (Beatrice, Stiers et al. 1984, Costantini, Chernyak et al. 1996), valamint a Mg^{2+} függő citokróm c felszabaduláshoz (Eskes, Antonsson et al. 1998).

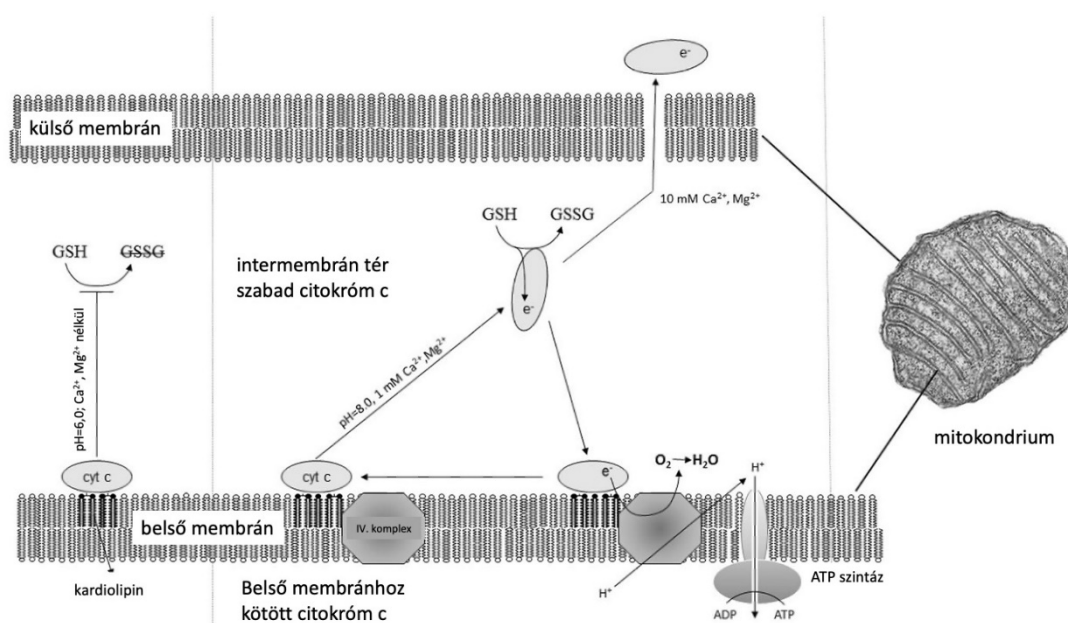
Vizsgálataink tovább erősítik ezt a feltételezést, ugyanis eredményeink alapján elmondható, hogy a szabad citokróm c oxidálja a glutationt, amely által növekszik az oxidatív stressz a mitokondriumban, reaktív oxigén gyökök képződése nélkül. Ezen módon a glutation szint csökkenése az oxidatív stressz kialakulása révén hat közvetlenül az apoptózis megindításának irányába. Ekkor az oxidált glutation arányának növekedésével nem csak az oxidált molekulák aránya növekszik, hanem egyúttal az antioxidáns koncentráció is csökken.

Fontos megjegyeznünk, hogy a korábban leírtaknak megfelelően a citokróm c a reaktív oxigén gyökök eliminálásán keresztül csökkentheti az oxidatív stresszt, és ezáltal az apoptózis kialakulásának esélyét, amennyiben szuperoxid dizmutázként funkcionál (Sahin-Tóth, Kukor et al. 1997, Tóth, Kukor et al. 1997).

A Mg^{2+} fiziológiás koncentrációban (0,8-1,2 mM) képes apoptózist kiváltani a praeeclampsias placenta szövet kultúrában. Az apoptózist mérsékelten antioxidáns ágensek (például aszkorbinsav és az N-acetil-cisztein) képesek mérsékelni (Black, Yu et al. 2001). A szérum Mg^{2+} szintje csökken a normál várandósság során, viszont emelkedik praeeclampsia esetén (Sanders, Konijnenberg et al. 1999). Vizsgálataink

alapján a megemelkedett Mg^{2+} -szint a korábbiakban leírtaknak megfelelően a szabad citokróm c arányának és ezáltal a glutation oxidációjának növeléséhez vezetnek, amely az apoptózis folyamatának inicializálását elősegítheti. Ez pedig felhívja a figyelmet a Mg^{2+} pótlás előnyeinek és szükségességének értékelésére.

A glutation melletti mitokondriális oxigénfogyasztás a kísérleteinkből arra enged következtetni, hogy a szabad citokróm c a glutationról felvett elektronokat a légzési láncnak átadhatja. Ezáltal a szabad citokróm c hatékonyan tudja a redukált glutation szintet csökkenteni, az oxidáltat növelni. Ez hozzájárulhat az apoptózishoz (Elakkad, Mohamed et al. 2021). A citokróm c redukálhatja, hatástalaníthatja a H_2O_2 -t, emiatt antioxidáns hatással rendelkezik (Hancock, Desikan et al. 2001).



18. ábra: pH 6,0 mellett, illetve Ca^{2+} és Mg^{2+} hiányában a citokróm c nem képes a glutation oxidációjára. pH= 8,0, illetve 1 mM Ca^{2+} , vagy Mg^{2+} mellett a citokróm c disszociál a belső membránról, és képessé válik a glutation oxidálására, ahonnan a felvett elektron a IV. komplexhez juttatja, az átadott elektron ATP előállítására használdik fel. Viszont 10 mM Ca^{2+} , vagy Mg^{2+} mellett a citokróm c képessé válik a mitokondrium elhagyására.

5.12. Statinok apoptotózist befolyásoló hatása

A statinok több módon is képesek az apoptózis befolyásolására. Az eredmények nem egyértelműek, ugyanis a lipofil statinok kimondottan elősegítik, míg a hidrofil statinok nem befolyásolják, vagy éppen gátolják az apoptotikus folyamatokat (Dymkowska, Wrzosek et al. 2021). A lipofil és a hidrofil statinok különböző tulajdonságokkal jellemezhetőek. Csak a lipofil statinok (simvastatin, atorvastatin, lovastatin, fluvastatin, cerivastatin, pitavastatin) képesek növelni a vaszkuláris simaizomsejtek apoptózisát, akár a túlélési faktorok jelenlétében is. Ezzel ellentétben a hidrofil statinok (pravastatin, rosuvastatin) képesek az apoptotikus folyamatok gátlására is (Erl 2005).

A statinok többféle módon képesek az apoptózist elősegíteni. A statinok a HMG-CoA reduktáz specifikus inhibitorai, amin keresztül csökkentik a koleszterin szintézis köztes termékeinek mennyiségét (izoprenoid farnezil pirofoszfát, geranilpirofoszfát). Több fehérje (Ras, Ros, Rac) poszt-transzlációs prenilációja csökken a hatásukra. Mindez a fehérjék funkciójának megfelelően számos sejtelettani folyamatot befolyásol, például a szignalizációt, differenciációt és az apoptózist (Egom and Hafeez 2016). A statin kezelések esetében kimutatták, hogy inaktíválja a p-21 Rho fehérjét, annak prenilációján keresztül és ebből kifolyólag alulszabályozódik az anti-apoptotikus Bcl-2 fehérje, vagy stimulálja a TNFaR expressziót, és így potenciózza a TNFa-mediált apoptózist. A statinok csökkentik a túlélési faktorok expresszióját, például a survivin-ét (Katsiki, Tziomalos et al. 2010). Mindezek alapján látható, hogy a statinok igen szerteágazóan képesek befolyásolni a sejtek működését.

A korábban leírtaknak megfelelően, a programozott sejthalál lépései során a citokróm c több kulcsszereppel is bír. Laboratóriumi megfigyelések alapján elmondható, hogy a simvastatin ROS képződést indít meg a KKU-100 sejtekben, de a KKU-M214 sejtekben nem (mindkettő cholangiocarcinoma sejtvonal). A simvastatin megnöveli a citokróm c és a kaszpáz 3 felszabadulást és növeli a p21 szintet a cholangiocarcinoma sejtvonalakban, különösen a KKU-100 sejtekben (Buranrat, Senggunprai et al. 2016). Ez felhívja a figyelmet arra, hogy nem csak sejttípusonként képesek eltérő hatással bírni a statinok.

A lipofil és hidrofil statinok hatása közötti különbségeket nőgyógyászati eredetű (ovárium, endometrium és cervikális) sejtvonalakon is vizsgálták. A lipofil statinok

(lovastatin és simvastatin) aktiválták az extrinsic és intrinsic apoptotikus kaszkádot és elősegítették a citokróm c kijutást a mitokondriumból. Másoldalról a pravastatin (hidrofil) nem indukált apoptózist. Fontos megjegyezni, hogy kizárólag a tumoros sejtek voltak érzékenyek a statinok apoptotikus hatására, a normál sejtekre ez nem volt jellemző (Kato, Smalley et al. 2010).

Amikor a programozott sejthalál megindul és a légzési láncot a citokróm c elhagyja, mint elektron átvivő fehérje, megszűnik a kapcsolat a III. és a IV. komplexek között. Ez a mitokondriális membrán potenciál csökkenéséhez vezet, és ennek megfelelően az ATP szintézis is csökken. Ez a mitokondriumban a reaktív oxigén gyökök képződésének megemelkedésével jár, amely megindíthatja, vagy fenntarthatja a programozott sejthalált. A citokróm c szintén elősegítheti az apoptózist, ugyanis aktiválhatja a kaszpáz kaszkádot. A citokróm c ezek alapján fontos szerepet játszik a sejtekben, ugyanis segít megtartani a redox egyensúlyt, valamint antioxidánsként képes viselkedni (Hancock, Desikan et al. 2001).

Jól ismert, hogy a szabad citokróm c képes átalakítani a szuperoxidot oxigénné, ennek antioxidáns és antiapoptotikus hatása is van. Az abszorbeált elektron képes a IV. komplexre jutni, ha a citokróm c köt a belső membránhoz. Ha a citokróm c inkább a glutathion által redukálódik, mint a szuperoxid révén, akkor a citokróm c elveszti antioxidáns tulajdonságát. A simvastatin képes elősegíteni az apoptotikus utat, a citokróm c glutathion általi redukciójának elősegítése által. Hancock és munkatársai feltételezik, hogy a citokróm c apoptotikus hatása függhet a redox állapottól (Hancock, Desikan et al. 2001). Ennek megfelelően az oxidált szabad citokróm c erősebb apoptotikus hatással bír, mint a redukált forma (Pan, Voehringer et al. 1999). Ez a hipotézis ellentmond mérési eredményeinknek. A citokróm c glutathionnal történő redukciójának antiapoptotikus hatása lehet. Összhangban a mérési eredményeinkkel, a mitokondrium oxigénfogyasztása megnövekszik simvastatin hatására, ami azt sugallja, hogy a citokróm c reoxidálódhat és a glutathionból származó elektron végül molekuláris oxigén kialakításához járul hozzá. Hancock és munkatársainak hipotézisét megcáfolja az a megfigyelés is, hogy a citokróm c apoptotikus hatása független a redox állapottól (Hampton, Zhivotovsky et al. 1998).

5.13. A statinok antitumor hatása

A statinok antitumor hatásának vizsgálata során a kutatók szignifikáns különbséget találtak a hidrofil és a hidrofób statint használók között. A témában végzett metaanalízisek azt mutatják, hogy a lipofil statinok segíthetnek megelőzni a hepatocellularis karcinóma kialakulását. A hidrofil statinok esetében ilyen nem tudtak kimutatni. Ez az összefüggés főként az összességében nagyobb mennyiségű statint szedett betegek esetében volt kimutatható (Li, Sheng et al. 2020, Wang, Wang et al. 2022). A statinok antitumor hatását sokan vizsgálták, és emlő daganatok esetében is hasonló eredményre jutottak. A klinikai vizsgálatok során a lipofil statinok nagymértékű védelmet mutattak az emlődaganattal diagnosztizált betegek esetében, addig a hidrofil statinok nem változtattak a teljes mortalitáson (Liu, Yi et al. 2017).

Simvastatin kezelés ferroptózist és apoptózist képes okozni emlő daganat sejteken. A vizsgálatok csökkent glutation és emelkedett reaktív oxigén gyök szinteket mutattak. A megemelkedett reaktív oxigén gyök és a csökkent glutation koncentrációnak megfelelően a glutation oxidáz magas szintje várható, viszont a vizsgálatok csökkent glutation oxidáz szintet mutattak (Elakkad, Mohamed et al. 2021). Ezt az ellentétet a vizsgálataink feloldhatják, ugyanis kimutattuk, hogy a szabad citokróm c csökkenti a redukált glutation koncentrációját, függetlenül a glutation oxidáztól.

A fluvastatin (lipofil statin), hepatocelluláris karcinóma sejtvonalakban, megindíthatja az apoptózis mitokondriális útját (Wang, Wang et al. 2022). Ennek a folyamatnak a során az anti-apoptotikus Bcl2 expressziója csökken, míg a pro-apoptotikus Bax expressziója fokozódik. A citokróm c kilépése a citoszolba megfeleltethető a kaszpáz aktivációnak (Jiang and Wang 2004). Vizsgálták a lipofil statinok és a hidrofil pravastatin hatását patkány vázizom sejtvonalon és mitokondriumon. 100 μ M statin koncentráció mellett, a lipofil statinok apoptózist indukáltak és felerősítették a citokróm c kiáramlását a mitokondriumból, valamint gátolták a zsírsavak β -oxidációját, ugyanakkor a pravastatin nem okozott hasonló folyamatokat, és a zsírsavak β -oxidációját is sokkal kevésbé gátolta. Amint azt már bemutattuk, a statinok a mitokondriális membránpotenciál csökkenését okozzák (Kaufmann, Török et al. 2006).

Munkánk segít pontosítani a különbségeket a lipofil és a hidrofil statinok működési mechanizmusában. Fiziológiai alapon magyarázható, hogy a pravastatin és a simvastatin köt a kardiolipinhez és ennél fogva nem képes megemelni a citokróm c glutationt oxidáló kapacitását. A membránról történő disszociáció mellett, a pravastatin csökkenti a citokróm c redukcióját, míg a simvastatin növeli azt. Ezen eredmények alapján azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a pravastatin és a simvastatin megváltoztatja a mitokondrium oxigén fogyasztását a citokróm c oxidációs kapacitásának megváltoztatása révén.

Az eredményeinken alapulva egy modellt alkottunk (19. ábra). Intakt mitokondrium esetén a statinok nem befolyásolják a citokróm c kötődését a belső membránhoz. Amennyiben a citokróm c az intermembrán térbe kerül, képessé válik a glutation oxidációjára és a felvett elektront a IV. komplexhez juttatja, ezáltal a glutation képes megnövelni a mitokondrium oxigénfogyasztását. A glutation oxidációja független a protongradienstől, ellentétben a fiziológias légzési szubsztrátokkal. A simvastatin képes elősegíteni, míg a pravastatin képes gátolni a citokróm c oxidációs hatását. A glutation oxidációja elősegíti a citokróm c mitokondriumból történő felszabadulását. Ebből következik, hogy a mitokondrium sérülése esetén a simvastatin képes előmozdítani az apoptózist, míg a pravastatin gátolni azt.

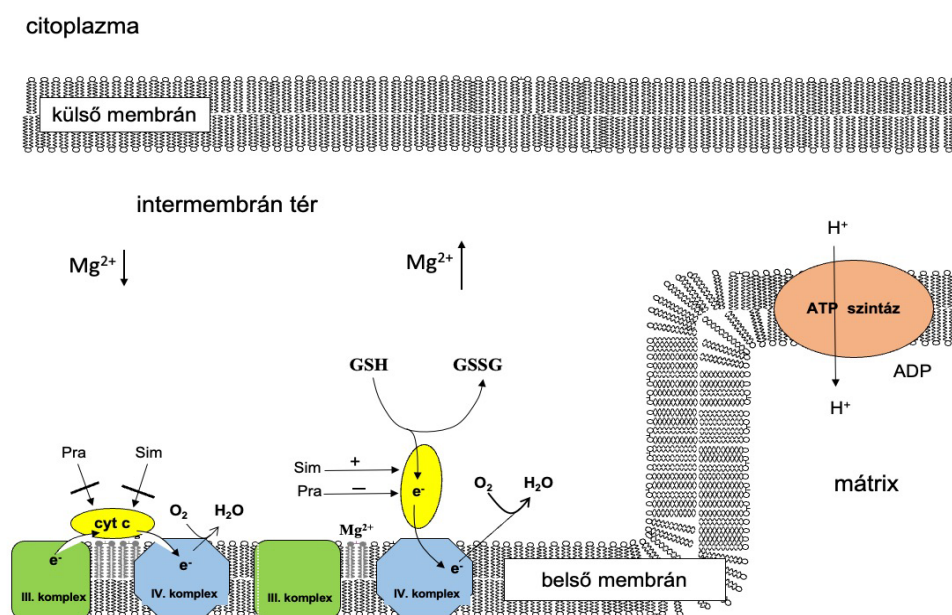
A lehetséges terápiás felhasználások kiterjesztése, a statinok pleiotrop hatásai miatt, intenzív vizsgálatok alatt állnak (Sahebkar, Kiaie et al. 2021, Riesen 2022). A statinok hatásának diverzitása új terápiás lehetőségeket nyithat meg. A vizsgálataink alapján érdemes újra gondolni a statinok alkalmazását olyan esetekben, amelyeknél a terápia része nagy mennyiségű Mg^{2+} alkalmazása (például praeeclampsia esetén), különösen, ha emellett a kórkép esetében megnövekedett apoptózis megfigyelhető. Szubarachnoidealis haemorrhagia esetén az elhalálozottak száma 14 nap alatt a duplájára nőtt, amennyiben a terápia során statint és Mg^{2+} -t egyszerre használnak, szemben a kizárólagos statin terápiával (Hosseini Siyanaki, Lucke-Wold et al. 2022). A simvastatin apoptózist indukáló és sejt-ciklust gátló hatása szintén hasznosnak bizonyulhat.

Ismert, hogy a simvastatin megemeli az apoptózist a daganatos sejtek körében (Black, Yu et al. 2001, Brzezinski, Moe et al. 2021). Az eredményeink alapján érdemes átgondolni a simvastatin terápia kiegészítését Mg^{2+} -mal tumoros sejtek esetében, az

apoptózis mértékének növelése érdekében. Az apoptotikus folyamat elősegíti a glutation oxidációját citokróm c által, ezáltal csökkentve az ATP szintet, mivel az oxigén felhasználás és az ATP szintézis szétválík.

A praeclampsia az egyik legveszélyesebb betegség várandósok esetében, és jelenleg nincsen definitív terápiája. A statin terápia az egyike a számos ígéretes terápiának, de a HMG-CoA gátlás miatt a magzati hatásai kérdésesek, ezért jelenleg nem ajánlott szer várandósság alatt. A sejtosztódás gátlása és az apoptózis elősegítése a várandósság alatt káros, így ilyen esetekben hidrofil statin (pravastatin) terápia preferálandó a lipofil statinok alkalmazásával szemben. A pravastatin alkalmazása azzal is járhat, hogy elősegíti a placenta arginin felvételét, amely előnyös lehet az arginin-deficiens praeclampsziában (Pánczél, Kukor et al. 2019, Pánczél, Supák et al. 2020).

A statinok széleskörű használata és a hatásmechanizmusuk diverzitása, különösen az apoptózisra kifejtett hatásuk, megkívánják további klinikai vizsgálatok elvégzését, melyeknek reményeink szerint, munkánk alapjául szolgálhat.



19. ábra: A statinok hatásának szemléltetése vizsgálataink alapján. Alacsony magnézium szint mellett sem a simvastatin (sim), sem a pravastatin (pra) nem képes a citokróm c (cit c) működésének befolyásolására, így a citokróm c a III. és a IV. komplex közötti elektrontranszportot végzi. A Mg²⁺ szint emelkedése esetén a simvastatin

felgyorsítja a glutation (GSH) átalakulását oxidált glutationná (GSSG), mely a mitokondrium oxigénfogyasztását megemeli.

5.14. A statinok szerepe a központi idegrendszer sérüléseinek esetében

A szervezetben az összes koleszterin 25%-a a központi idegrendszerben található, főként a myelinben. A központi idegrendszer esetében a koleszterin szintézise helyben történik, ugyanis a vér-agy gát megakadályozza a lipoproteinekből a koleszterin cseréjét (Björkhem, 2004). A koleszterin szintézise szükséges többek között az axonok és a szinapszisok működésének fenntartásához és szintéziséhez (Pfrieger, 2003).

Patkányokon végzett kísérletek alapján kimutatták, hogy mind a simvastatin, mind az atorvastatin csökkenti a központi idegrendszerben a koleszterin szintézist (Cibickova, 2008).

Általánosan elmondható, hogy a gerincvelő sérültek esetében jelentős számban találhatók olyanok, akik statin terápia alatt állnak (Triplet, 2021). Számottevő vizsgálat nem történt a statinok szedése mellett történt gerincvelő sérülés utáni motoros aktivitás csökkenés mértékéről. A statin terápia és a gerincvelő sérülés együttes jelenléte esetén feltételezhető egymást erősítő hatásuk a motoros aktivitás csökkenésében (Triplet, 2021).

5.15. Minimál invazív gerincvelő sértéses modell

Tekintettel a világszerte széles körben alkalmazott statinokra, a gerincvelő sérülések esetén fontosnak tartjuk annak vizsgálatát, hogy a statinok miként befolyásolják a sérülést környező neuronok apoptotikus folyamatait, valamint van-e különbség a statinok hatása között, oldhatóságuk alapján a korábbi eredményeinkre alapozva. Mivel több eredmény támasztja alá, hogy a statinok neuromuszkuláris betegségek esetén ronthatják a páciens állapotát (Murinson, Haughey et al. 2012), a gerincvelő sértéses módszerrel nyerhető adataink segíthetnek ennek további feltárásában. Az általunk a korábbiakban is alkalmazott gerincvelő sértési módszer egy jó alapot kínál

ezen folyamatok vizsgálatához (Borbély, Csomó et al. 2017). Az állatok túlélését és jóllétét és a vizsgálat pontosságát, viszont javítani szeretnénk volna.

Az új, minimál invazív gerincvelő sértéses technikát azért fejlesztettük ki, mivel azzal szembesültünk, hogy problémák lépnek fel a beavatkozást követően. Ezek a problémák többek között azon alapulnak, hogy a laminektómia során keletkező csontszilánkok kompressziót okozhatnak, valamint gerincvelő sérülést; a műtét túl hosszú ideig tart, továbbá a nagyobb felületű csontseb lassan gyógyul. A laminektómia kiiktatásával a beavatkozás sokkal gyorsabbá vált (11 percre csökkent 35 percről), a gerinccsatorna ép marad, a csontseb kisebb, továbbá nem keletkeznek csontszilánkok, melyek a gerincvelő sérülését okoznák.

A processus spinosus eltávolítása nem hagyható el, ugyanis a cranialis processus spinosus eltávolítása szükséges, hogy caudalis processus spinosust hátra tudjuk dönteni. Az eltávolítás segítségével jó rálátás nyílik a gerincvelőre, a hemiszekció elvégzéséhez. A hemiszekció a beavatkozás legkritikusabb része. Mi a hemiszekciót szabad kézzel végeztük el, de ez nem követelmény. Akár sztereotaxiás készülék is használható az gerincvelő átmetszés kivitelezéséhez. A patkány elhelyezhető a sztereotaxiás készülékben, az állat stabilitásának biztosítása érdekében, a beavatkozás során (Brown and Martinez 2019). Ez a lépés lényegében nem változtat a leírt technikánkon, viszont rendkívül hasznos lehet a pontos kivitelezés szempontjából.

Az új technika nagyon sokoldalú. A vizsgálataink során az L4 lumbális szegmentumban (L1-es csigolya) végeztük a beavatkozást; viszont a módszer bármely gerincvelő szegmentum esetében alkalmazható a vizsgálati céloknak megfelelően (a módszert alkalmaztuk thoracalis és cervicalis régióban is). A módszer alkalmazása során teljes és részleges átmetszés is alkalmazható. A csigolya megemelése közvetlen rálátást biztosít a gerincvelőre. A teljes átmetszés módosításával, akár egy kis korong is eltávolításra kerülhet a gerincvelőből.

Az új technika alkalmazása nem csak patkány esetében lehetséges, hanem más fajok esetén is adaptálható (például egér, sertés, kutya). A technika legjelentősebb limitációja, hogy a sértés csak az intervertebrális térben valósítható meg, vagyis nem alkalmazható, ha a célterület a csigolyának megfelelően található. Ezt a nehézséget az állat életkorának megfelelő megválasztásával lehet áthidalni, ugyanis a növekedés alatt a gerincvelői

szegmensek pozíciója folyamatosan caudalis irányba tolódik a csigolyákhoz képest, vagyis van olyan időszak, amikor intervertebrálisra foglal helyet. Továbbá, lévén nyitott gerincvelő sértéses technika, nem alkalmas a kontúziós, vagy a kompressziós sérülések modellezésére.

Ez a technika ideális választás lehet a nyitott gerincvelő sértéses vizsgálatokhoz, a féloldali, vagy teljes átmetszés precíz végrehajthatósága és könnyű ismételhősége miatt. A gerincvelői folyamatok kevesebb műtermék mellett vizsgálhatók, mivel a gerinccsatorna épnek tekinthető. Ez különösen abban az esetben fontos, amikor minimál invazív terápiás módszereket vizsgálnak. A technika használata mellett a fókusz a tényleges vizsgálat értékelésén lehet és nem a sebészi technika által okozott esetleges műtermékeken (Ashammakhi, Kim et al. 2019).

Ez az új, minimál invazív technika nem igényel új felszerelést vagy jelentős beruházást. Olyan laborban, ahol már végeznek nyitott gerincvelő sértéses beavatkozásokat, nem szükséges semmilyen beruházást végrehajtani. Könnyen adaptálható a vizsgálatoknak megfelelően (a sérülés területe; részleges, vagy teljes átmetszés; az állat típusa). Könnyen elsajátítható a technika. Ezért ez a technika felkeltheti azon kutatók érdeklődését, akik nyitott gerincvelő sértéses technikát alkalmaznak.

A 3R elvek irányadó elvek az állatok etikai felhasználásához állat kísérletekben. Angolul a 3R Replace, Reduce and Refine, azaz magyarul helyettesíteni, csökkenteni és finomítani, vagyis ahol lehet ne állatot használjanak, ahol lehet csökkentsék a felhasznált állatok számát, illetve finomítani az alkalmazott módszert, hogy kíméletesebb legyen az állatokkal szemben. Ezen alapelveknek megfelelően a technika finomítása az állatok jóllétének fontos befolyásoló tényezője. Az általunk fejlesztett minimálinvazív gerincvelő sértéses modell ennek megfelel.

6. Következtetések

6.5. 1. célkitűzés értékelése (a citokróm c redukció vizsgálata)

Sikerült megvizsgálnunk a membránkött és a szabad citokróm c redukciója közötti különbséget, glutation jelenlétében, amennyiben a pH változik.

Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy a citokróm c membránkött formában a pH változás ellenére nem emeli a glutation oxidációt statisztikailag értékelhető mértékben.

A szabad citokróm c esetében a pH növekedése a glutation oxidációjának sebességét is emeli.

6.6. 2. célkitűzés értékelése (a citokróm c redukció sebességének vizsgálata Mg^{2+} , illetve a Ca^{2+} ionok jelenlétében)

A Mg^{2+} , illetve a Ca^{2+} ionok befolyásolják a citokróm c redukció sebességét, annak emelését okozva. Ezt a hatásukat mind a szabad citokróm c, mind a membránkött forma esetében kifejtik.

Ezt a célkitűzést azzal is árnyaltuk, hogy a Mg^{2+} koncentrációjának emelkedése képes elősegíteni a statinok citokróm c-t befolyásoló hatását.

Vizsgálataink alapján kimutatható különbség nincsen a Mg^{2+} , illetve a Ca^{2+} ionok hatása között, az alkalmazott koncentrációknak megfelelően.

6.7. 3. célkitűzés értékelése (a citokróm c redukció sebességének vizsgálata simvastatin, illetve pravastatin jelenlétében)

Sikerült megvizsgálunk a simvastatin és a pravastatin hatását a citokróm c redukciójára glutation jelenlétében. Eredményeink alapján a statinok befolyásolják a szabad citokróm c glutationt oxidáló képességét. A simvastatin gyorsítja az oxidációt, míg a pravastatin lassítja azt. A hatás koncentrációfüggő.

6.4. 4. célkitűzés értékelése (glutation, mint légzési szubsztrát vizsgálata)

Sikerült igazolnunk, hogy a mitokondrium légzési szubsztrátjaként funkcionálhat a glutation. Modellünk szerint a citokróm c membránkött módon nem képes, ám szabad fehérjeként, az intermembrán térben képes a glutation oxidálására. Méréseink alapján 1 mM Mg^{2+} , illetve a Ca^{2+} mellett glutation jelenlétében a mitokondriális oxigénfogyasztás szignifikánsan megemelkedik, így kijelenthetjük, hogy a mitokondrium képes a glutationt légzési szubsztrátként használni.

6.5. 5. célkitűzés értékelése (pravastatin és simvastatin mitokondriális oxigénfogyasztásra gyakorolt hatásának vizsgálata)

Sikerült megvizsgálnunk, hogy a pravastatin és a simvastatin befolyásolhatja-e a mitokondrium oxigénfogyasztását glutation jelenlétében.

Eredményeink alapján a mitokondriális oxigénfogyasztás nő 1 mM glutation és simvastatin jelenlétében, viszont 1 mM glutation és pravastatin jelenlétében csökken. A változások szignifikánsak.

6.6. 6. célkitűzés értékelése (annak vizsgálata, hogy a pravastatin és a simvastatin közvetlenül befolyásolja-e a citokróm-c működését)

Sikerült azonosítani a citokróm c-t, mint a pravastatin és simvastatin új célpontját. Ennek a megfigyelésnek a gyógyszerek hatásmechanizmusának értelmezésében lehet szerepe.

6.7. 7. célkitűzés értékelése (gerincvelő sértési protokoll minimálinvazívitásának vizsgálata)

Az új gerincvelő sértési eljárás gyorsabban kivitelezhető, valamint lényegesen kisebb csontsebet okoz.

6.8. 8. célkitűzés értékelése (annak vizsgálata, hogy az átdolgozott gerincvelő sértési protokoll mennyiben felel meg a 3R szabálynak)

A 3R elvnek megfelelően sikerült finomítanunk a módszeren, melynek következtében a seb kisebb mértékű, kevésbé invazív a beavatkozás, és gyorsabban is végrehajtható. Így a statinok gerincvelő sérülés esetén létrejövő neuronális apoptózisban betöltött hatásának vizsgálatára alkalmasabb, a hagyományos módszerhez képest

6.9. További következtetések

Továbbá szeretném kiemelni, hogy vizsgálatunk az előzetes kérdésfelvetéseinken túl milyen eredményeket hoztak.

Sikerült a citokróm c, és a glutathion függvényében árnyalni a belső mitokondriális apoptotikus út működését.

A simvastatin okozta apoptózis esetében megfigyelt ellentmondásokat eredményeink magyarázhatják. A csökkent glutathion oxidáz koncentráció mellett mért magas oxidált glutathion koncentrációra kielégítő magyarázatot ad a szabad citokróm c általi glutathion oxidáció.

Kimutattuk, hogy a citokróm c antioxidáns hatása mellett prooxidáns hatással rendelkezik. Eredményeink azt sugallják, hogy a mitokondrium membránközti terében a citokróm c hatékonyan csökkentheti a redukált glutathion koncentrációját, molekuláris oxigén segítségével.

Sikerült Hancock és munkatársai (Hancock, Desikan et al. 2001) hipotézisének cáfolatát megerősíteni.

6.10. Összegzés

Vizsgálataink során szeretnénk volna jobban megérteni azoknak a mitokondriális folyamatoknak egy részét, melyek a citokróm c működését, ezen belül is oxidációs képességét befolyásolják.

A témának aktualitást ad a statinoknak nevezett gyógyszer család igen széles körben történő alkalmazása. Ezek a gyógyszerek számos igen jelentős tulajdonsággal bírnak, és bár alapvetően a koleszterinszintézis csökkentésének érdekében alkalmazzák őket, ezen felül pozitívan hatnak a vérnyomásra, gyulladásgátló hatással, neuroprotektív hatással, és antitumor hatással is bírnak. Viszont számos mellékhatásuk is van, amelyekkel a betegek életminőségét számottevően ronthatják, ilyenek a rabdomiolízis, a myopathia, és az akut pancreatitis.

Kutatócsoportunk számára különösen érdekes volt ez a gyógyszer csoport és mellékhatásai, tekintettel arra, hogy praeeclampsia esetén a magnézium és a statinok együttes alkalmazása az állapot romlásához vezethet. A két terápia együttes alkalmazása más területen (szubarachnoidealis haemorrhagia) is állapotromlást okozhat.

Vizsgálatainkat egyszerűen kivitelezhetőnek és könnyen ismételhetőnek terveztük. Tekintettel arra, hogy statinok sejttípusonként eltérő módon befolyásolhatják azok működését, így a könnyű ismételhetőséggel a könnyű validálhatóság megvalósítását is reméljük.

Vizsgálataink során sikerült igazolnunk, hogy a citokróm c membrán kötött és szabad formái eltérnek a glutationt oxidáló képességében, az oxidáció a szabad forma esetén megy végbe. Sikerült arra is fényt derítenünk, hogy az eltérés a foszfolipidekkel történő kötés miatt áll fent.

A Ca^{2+} és a Mg^{2+} vizsgálata alapján elmondhatjuk, hogy ezek a kationok egyértelműen növelik a citokróm c oxidáló képességét. Vizsgálataink arra is rámutattak, hogy ezt két módon teszik. Egyrészt a citokróm c oxidáló sebességét is növelik közvetlenül. Másrészt a Ca^{2+} és a Mg^{2+} ionok a membránkötés megszűnését is kiváltják, ezáltal citokróm c felszabadulást okoznak, melynek így már van glutationt oxidáló képessége.

Ezen vizsgálataink kellő alapot biztosítottak a statinokkal történő vizsgálatok kivitelezéséhez.

Vizsgálataink kivitelezéséhez mind lipofil, mind hidrofil statint szerettünk volna használni, tekintettel azok eltérő mellékhatásaira. Lipofil statinként simvastatint, míg hidrofil statinként pravastatint alkalmaztunk.

Az eltérő oldhatóságú statinok hatásában különbség mutatkozott. Mindkét statin befolyásolja a citokróm c működését annak szabad állapotában, viszont hatásuk ellentétes. A glutation oxidációja a lipofil simvastatin hatására megnőtt, míg a hidrofil pravastatin ezt csökkentette.

A glutation oxidációjának jelentős szerep jut az apoptózis megindításában, így, amennyiben ezt a gyógyszerek befolyásolják, azt figyelembe kell venni az egyes kórképek kezelésének során.

Mivel vizsgálataink azt is bizonyították, hogy a citokróm c-t csak szabad formában befolyásolják a statinok, így a Ca^{2+} és a Mg^{2+} ionok citokróm c-t felszabadító hatása is fontossá vált.

További vizsgálataink rámutattak, hogy a Mg^{2+} és simvastatin együttes alkalmazása a glutation oxidációt szignifikánsan gyorsítja.

Ez pedig magyarázhatja azt a megfigyelést, hogy a szubarachnoidealis haemorrhagia esetében együttesen alkalmazott statin és Mg^{2+} terápia miért emelte meg a halálozást.

Illetve ennek alapján figyelmet érdemelnek a praecclampsziában szenvedő várandós nők, illetve az ő gyógyszerelésük, tekintettel a lehetséges interakcióra.

Az apoptózis megindulásának még egy lehetséges útját sikerült feltérképeznünk, melyet a lipofil statinok potencírozhatnak.

A glutation oxidációja következtében a mitokondriumban az reaktív oxigén gyökök nélkül is erősen megnőhet az oxidok mennyisége, ami az oxidatív stresszt növelheti. Ennek lehetőségét sikerült bizonyítanunk azáltal, hogy a mitokondriális oxigénfogyasztást vizsgálva, annak növekedését tapasztaltuk az in vitro vizsgálatoknak megfelelő körülményeket teremtve. Ugyanis a Mg^{2+} önmagában, és a simvastatinnal együtt adva is megemeli az oxigén fogyasztást, ami a szabad citokróm c jelenlétét és ezáltal a glutation oxidációját igazolja in vivo körülmények között.

Ezek alapján elmondhatjuk, hogy az in vitro eredményeinket in vivo is sikerült igazolnunk. Ennek annak tekintetében van különösen jelentősége, hogy az in vitro vizsgálataink során szarvasmarha eredetű citokróm c-t használtunk, az in vivo vizsgálataink esetén pedig patkány máj mitokondriumot. Reményeink szerint ez alapot

nyújthat arra, hogy ezek a folyamatok általánosan léteznek az emlős sejtekben, így humán sejtekben is.

Reméljük, hogy vizsgálataink ezek alapján kiterjedhetnek humán mintákra is, igazolva ezen folyamatok általános érvényűségét. Továbbá reméljük, hogy ez a mostanában kevésbé kutatott területe a biokémiának újból érdekessé válhat.

Szeretnénk, ha munkánk a későbbiekben alapja lehetne a humán statin terápiaak megtervezésének.

Tervezzük neurális sérülés esetében a mitokondriális citokróm c működésének változását és a statinok apoptózist indukáló hatását vizsgálni. Ezen módszerekkel vizsgálnánk a klinikai ellátás egy fontos kérdését. A klinikai ellátás során megfogalmazódik, hogy a statin terápia alatt álló, akut központi idegrendszeri sérülést elszenvedők esetében a motoros aktivitás regenerációja a terápia alatt nem állókhoz képest csökkent mértékűnek várható-e. Ennek sejtélettani vizsgálatához ideális modellt nyújt a gerincvelő sértéses beavatkozás.

Minden gerincvelő sérülés modell küszködik hiányosságokkal. Így elmondható a zárt modellek esetében, hogy a sérülés pontos helyzete és mértéke nem megjósolható, ugyanis ekkor az ép struktúrájú gerinc, gerincvelő esetében egy külső behatás (például meghatározott tömegű súly ejtése meghatározott magasságból) a zárt rendszer esetében a sérülést csak széles hibahatár mellett tudja ismételni. A nyitott modellek esetében a műtét során bekövetkező, az összes szövetre kiterjedő járulékos sérülések, kifejezett gyulladásos reakciók jelenléte, a terület fertőződésének nagy esélye okoz jelentős hátrányokat, viszont jelentős előny, hogy a sérülés nagy pontossággal modellezhető.

Célunk volt, hogy a jelenleg alkalmazott, széles körben elterjedt nyitott gerincvelősértéses módszert módosítsuk, minimálinvazív beavatkozássá tegyük, ezáltal javítva mind az állatok életkörülményeit, mind a mérések pontosságát.

Eredményeink alapján a módszert sikeresen egyszerűsítettük és tettük minimál invazívvá. Ezzel a 3R szabálynak megfelelően csökkentettük a vizsgálatokhoz szükséges állatok számát, a várható alacsonyabb halálozás miatt, illetve a módszer finomításával a harmadik pillér kívánalmainak eleget tettünk. A módszer könnyen adaptálható, nem igényel speciális felszerelést vagy anyagot. A klasszikus módszerrel könnyen felcserélhető, az azt alkalmazó laboratóriumokban.

7. Összefoglalás, Summary

Vizsgálataink során szerettük volna jobban megérteni azoknak a mitokondriális folyamatoknak egy részét, melyek a citokróm c működését, ezen belül is oxidációs képességét befolyásolják.

Vizsgálatainkat egyszerűen kivitelezhetőnek és könnyen ismételhetőnek terveztük.

Vizsgálataink során sikerült igazolnunk, hogy a citokróm c membrán kötött és szabad formái eltérnek a glutationt oxidáló képességében, az oxidáció a szabad forma esetén megy végbe. Sikerült arra is fényt derítenünk, hogy az eltérés a foszfolipidekkel történő kötés miatt áll fent.

A Ca^{2+} és a Mg^{2+} vizsgálata alapján elmondhatjuk, hogy ezek a kationok egyértelműen növelik a citokróm c oxidáló képességét. Vizsgálataink arra is rámutattak, hogy ezt két módon teszik. Egyrészt a citokróm c oxidáló sebességét is növelik közvetlenül. Másrészt a Ca^{2+} és a Mg^{2+} ionok a membránkötés megszűnését is kiváltják, ezáltal citokróm c felszabadulást okoznak, melynek így már van glutationt oxidáló képessége.

Ezen vizsgálataink kellő alapot biztosítottak a statinokkal történő vizsgálatok kivitelezéséhez.

Vizsgálataink kivitelezéséhez mind lipofil (simvastatin), mind hidrofil (pravastatin) statint szerettünk volna használni, tekintettel azok eltérő mellékhatásaira. Az eltérő oldhatóságú statinok hatásában különbség mutatkozott, hatásuk ellentétes. A glutation oxidációja a lipofil simvastatin hatására megnőtt, míg a hidrofil pravastatin ezt csökkentette.

Mivel vizsgálataink azt is bizonyították, hogy a citokróm c-t csak szabad formában befolyásolják a statinok, így a Ca^{2+} és a Mg^{2+} ionok citokróm c-t felszabadító hatása is fontossá vált. További vizsgálataink rámutattak, hogy a Mg^{2+} és simvastatin együttes alkalmazása a glutation oxidációt szignifikánsan gyorsítja.

Az apoptózis megindulásának még egy lehetséges útját sikerült feltérképeznünk, melyet a lipofil statinok potencírozhatnak. A glutation oxidációja következtében a mitokondriumban a reaktív oxigén gyökök nélkül is erősen megnőhet az oxidok mennyisége.

The aim of our research was to further our understanding of those mitochondrial processes that determine the oxidation capacity of cytochrome c.

We designed our examinations to be easy to implement as well as easy to replicate.

During our examinations we successfully proved that the membrane bound and free type of cytochrome c differ in their oxidation capacity. Oxidation happens in the case of free cytochrome c. We also determined that this difference is due to bonds formed with phospholipids.

Based on our research of Ca^{2+} and Mg^{2+} , we determined that these cations significantly increase the oxidation capacity of cyt c. Our research also showed that this increase is due to two mechanisms. Firstly, these cations directly increase the oxidation capacity of cyt c. Secondly, Ca and Mg ions cause the release of the membrane-bound cyt c, which from thereon have the capacity to oxidate glutathione.

Following these experiments, we conducted further experiments to determine the effect of statins on the oxidation of glutathione. For our research we studied both lipophilic (simvastatin) and hydrophilic (pravastatin) to account for their differing side-effects. Our studies showed that lipophilic statin simvastatin had an opposite effect to hydrophilic pravastatin on the oxidation of glutathione: simvastatin increased the oxidation while pravastatin decreased the oxidation of glutathione. Our research showed that statins only affect cytochrome c in its free form. Our earlier results regarding the effect of Ca^{2+} and Mg^{2+} on freeing the membrane bound form of cytochrome c (thereby increasing free cytochrome c) become relevant here as well.

Our further studies showed that Mg^{2+} and simvastatin applied together significantly increased the speed of oxidation of glutathione.

We also found another potential pathway for apoptosis, facilitated by lipophilic statins. As a consequence of the oxidation of glutathione, the concentration of oxides can significantly increase even without the presence of reactive oxygen species, thereby increasing oxidative stress. We showed this by examining mitochondrial oxygen consumption, both in vitro using bovine cytochrome c and in vivo using rat liver mitochondria.

We plan to conduct further experiments on mitochondrial cytochrome c in cases of neural injury to investigate the apoptosis inducing effect of statins. For this we modified the widely used classical spinal chord injury technique and made it minimally invasive.

8. Irodalomjegyzék

- (1960). "The Principles of Humane Experimental Technique." Medical Journal of Australia **1**(13): 500-500.
- (1995). "Which anticonvulsant for women with eclampsia? Evidence from the Collaborative Eclampsia Trial." Lancet **345**(8963): 1455-1463.
- (2013). "Hypertension in Pregnancy: Executive Summary." Obstetrics & Gynecology **122**(5): 1122-1131.
- Abalos, E., L. Duley, D. W. Steyn and C. Gialdini (2018). "Antihypertensive drug therapy for mild to moderate hypertension during pregnancy." Cochrane Database Syst Rev **10**(10): Cd002252.
- Ádám, V. (2006). "Orvosi Biokémia." Medicina Könyvkiadó Zrt.
- Agouridis, A. P., M. S. Kostapanos and M. S. Elisaf (2015). "Statins and their increased risk of inducing diabetes." Expert Opin Drug Saf **14**(12): 1835-1844.
- Ahmed, R. U., M. Alam and Y. P. Zheng (2019). "Experimental spinal cord injury and behavioral tests in laboratory rats." Heliyon **5**(3): e01324.
- Al-Jameil, N., F. Aziz Khan, M. Fareed Khan and H. Tabassum (2013). A Brief Overview of Preeclampsia.
- Altman, D., G. Carroli, L. Duley, B. Farrell, J. Moodley, J. Neilson and D. Smith (2002). "Do women with pre-eclampsia, and their babies, benefit from magnesium sulphate? The Magpie Trial: a randomised placebo-controlled trial." Lancet **359**(9321): 1877-1890.
- Alvarez-Paggi, D., L. Hannibal, M. A. Castro, S. Oviedo-Rouco, V. Demicheli, V. Tórtora, F. Tomasina, R. Radi and D. H. Murgida (2017). "Multifunctional Cytochrome c: Learning New Tricks from an Old Dog." Chem Rev **117**(21): 13382-13460.
- Ambler, R. P. (1991). "Sequence variability in bacterial cytochromes c." Biochim Biophys Acta **1058**(1): 42-47.
- Aon, M. A., S. Cortassa, C. Maack and B. O'Rourke (2007). "Sequential opening of mitochondrial ion channels as a function of glutathione redox thiol status." J Biol Chem **282**(30): 21889-21900.

- Ashammakhi, N., H. J. Kim, A. Ehsanipour, R. D. Bierman, O. Kaarela, C. Xue, A. Khademhosseini and S. K. Seidlits (2019). "Regenerative Therapies for Spinal Cord Injury." Tissue Eng Part B Rev **25**(6): 471-491.
- Bartfai, T. (1979). "Preparation of metal-chelate complexes and the design of steady-state kinetic experiments involving metal nucleotide complexes." Adv Cyclic Nucleotide Res **10**: 219-242.
- Bayir, H., B. Fadeel, M. J. Palladino, E. Witasz, I. V. Kurnikov, Y. Y. Tyurina, V. A. Tyurin, A. A. Amoscato, J. Jiang, P. M. Kochanek, S. T. DeKosky, J. S. Greenberger, A. A. Shvedova and V. E. Kagan (2006). "Apoptotic interactions of cytochrome c: redox flirting with anionic phospholipids within and outside of mitochondria." Biochim Biophys Acta **1757**(5-6): 648-659.
- Beatrice, M. C., D. L. Stiers and D. R. Pfeiffer (1984). "The role of glutathione in the retention of Ca²⁺ by liver mitochondria." J Biol Chem **259**(2): 1279-1287.
- Belikova, N. A., Y. Y. Tyurina, G. Borisenko, V. Tyurin, A. K. Samhan Arias, N. Yanamala, P. G. Furtmüller, J. Klein-Seetharaman, C. Obinger and V. E. Kagan (2009). "Heterolytic reduction of fatty acid hydroperoxides by cytochrome c/cardiolipin complexes: antioxidant function in mitochondria." J Am Chem Soc **131**(32): 11288-11289.
- Belikova, N. A., Y. A. Vladimirov, A. N. Osipov, A. A. Kapralov, V. A. Tyurin, M. V. Potapovich, L. V. Basova, J. Peterson, I. V. Kurnikov and V. E. Kagan (2006). "Peroxidase activity and structural transitions of cytochrome c bound to cardiolipin-containing membranes." Biochemistry **45**(15): 4998-5009.
- Biochemistry, N. C. o. t. I. U. o. (1992). "Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry (NC-IUB). Nomenclature of electron-transfer proteins. Recommendations 1989." J Biol Chem **267**(1): 665-677.
- Black, S., H. Yu, J. Lee, M. Sachchithanathan and R. L. Medcalf (2001). "Physiologic concentrations of magnesium and placental apoptosis: prevention by antioxidants." Obstet Gynecol **98**(2): 319-324.
- Bonsu, K. O., D. D. Reidpath and A. Kadirvelu (2015). "Effects of Statin Treatment on Inflammation and Cardiac Function in Heart Failure: An Adjusted Indirect Comparison Meta-Analysis of Randomized Trials." Cardiovasc Ther **33**(6): 338-346.

- Borbély, Z., B. K. Csomó, Á. Kittel, G. Gerber, G. Varga and E. S. Vizi (2017). "Effect of rat spinal cord injury (hemisection) on the ex vivo uptake and release of [(3)H]noradrenaline from a slice preparation." Brain Res Bull **131**: 150-155.
- Brookes, P. S., Y. Yoon, J. L. Robotham, M. W. Anders and S. S. Sheu (2004). "Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle." Am J Physiol Cell Physiol **287**(4): C817-833.
- Brown, A. R. and M. Martinez (2019). "Thoracic Spinal Cord Hemisection Surgery and Open-Field Locomotor Assessment in the Rat." J Vis Exp(148).
- Brzezinski, P., A. Moe and P. Ädelroth (2021). "Structure and Mechanism of Respiratory III-IV Supercomplexes in Bioenergetic Membranes." Chem Rev **121**(15): 9644-9673.
- Buranrat, B., L. Senggunprai, A. Prawan and V. Kukongviriyapan (2016). "Simvastatin and atorvastatin as inhibitors of proliferation and inducers of apoptosis in human cholangiocarcinoma cells." Life Sci **153**: 41-49.
- Chen, C. J., D. Ding, N. Ironside, T. J. Buell, L. J. Elder, A. Warren, A. P. Adams, S. J. Ratcliffe, R. F. James, N. S. Naval, B. B. Worrall, K. C. Johnston and A. M. Southerland (2019). "Statins for neuroprotection in spontaneous intracerebral hemorrhage." Neurology **93**(24): 1056-1066.
- Circu, M. L. and T. Y. Aw (2008). "Glutathione and apoptosis." Free Radic Res **42**(8): 689-706.
- Circu, M. L. and T. Y. Aw (2012). "Glutathione and modulation of cell apoptosis." Biochim Biophys Acta **1823**(10): 1767-1777.
- Circu, M. L. and T. Y. Aw (2012). "Intestinal redox biology and oxidative stress." Semin Cell Dev Biol **23**(7): 729-737.
- Clayton, D. A. and G. S. Shadel (2014). "Isolation of mitochondria from cells and tissues." Cold Spring Harb Protoc **2014**(10): pdb.top074542.
- Cortese, J. D., A. L. Voglino and C. R. Hackenbrock (1995). "Persistence of cytochrome c binding to membranes at physiological mitochondrial intermembrane space ionic strength." Biochim Biophys Acta **1228**(2-3): 216-228.
- Cortese, J. D., A. L. Voglino and C. R. Hackenbrock (1998). "Multiple conformations of physiological membrane-bound cytochrome c." Biochemistry **37**(18): 6402-6409.

Costantini, P., B. V. Chernyak, V. Petronilli and P. Bernardi (1996). "Modulation of the mitochondrial permeability transition pore by pyridine nucleotides and dithiol oxidation at two separate sites." J Biol Chem **271**(12): 6746-6751.

Csomó, K., A. Belik, A. Hrabák, B. Kovács, O. Fábián, S. Valent, G. Varga and Z. Kukor (2022). "Effect of Pravastatin and Simvastatin on the Reduction of Cytochrome C." J Pers Med **12**(7).

Csomó, K. B., B. A. B, A. P. Sándor, A. A. Belik, G. Varga, A. Hrabák and Z. Kukor (2022). "Characterization of oxidation of glutathione by cytochrome c." J Bioenerg Biomembr **54**(1): 1-8.

Díaz-Quintana, A., G. Pérez-Mejías, A. Guerra-Castellano, M. A. De la Rosa and I. Díaz-Moreno (2020). "Wheel and Deal in the Mitochondrial Inner Membranes: The Tale of Cytochrome c and Cardiolipin." Oxid Med Cell Longev **2020**: 6813405.

Duley, L., A. M. Gülmezoglu and D. Chou (2010). "Magnesium sulphate versus lytic cocktail for eclampsia." Cochrane Database Syst Rev **2010**(9): Cd002960.

Duley, L., A. M. Gülmezoglu, D. J. Henderson-Smart and D. Chou (2010). "Magnesium sulphate and other anticonvulsants for women with pre-eclampsia." Cochrane Database Syst Rev **2010**(11): Cd000025.

Duley, L., D. J. Henderson-Smart and D. Chou (2010). "Magnesium sulphate versus phenytoin for eclampsia." Cochrane Database Syst Rev(10): Cd000128.

Duley, L., D. J. Henderson-Smart, G. J. Walker and D. Chou (2010). "Magnesium sulphate versus diazepam for eclampsia." Cochrane Database Syst Rev **2010**(12): Cd000127.

Dymkowska, D., A. Wrzosek and K. Zabłocki (2021). "Atorvastatin and pravastatin stimulate nitric oxide and reactive oxygen species generation, affect mitochondrial network architecture and elevate nicotinamide N-methyltransferase level in endothelial cells." J Appl Toxicol **41**(7): 1076-1088.

Egom, E. E. and H. Hafeez (2016). "Biochemistry of Statins." Adv Clin Chem **73**: 127-168.

Eiland, E., C. Nzerue and M. Faulkner (2012). "Preeclampsia 2012." Journal of Pregnancy **2012**: 586578.

Elakkad, Y. E., S. N. S. Mohamed and N. Z. Abuelezz (2021). "Potentiating the Cytotoxic Activity of a Novel Simvastatin-Loaded Cubosome against Breast Cancer

Cells: Insights on Dual Cell Death via Ferroptosis and Apoptosis." Breast Cancer (Dove Med Press) **13**: 675-689.

Elmer-Dixon, M. M., Z. Xie, J. B. Alverson, N. D. Priestley and B. E. Bowler (2020). "Curvature-Dependent Binding of Cytochrome c to Cardiolipin." J Am Chem Soc **142**(46): 19532-19539.

Endo, T., K. Yamano and S. Kawano (2010). "Structural basis for the disulfide relay system in the mitochondrial intermembrane space." Antioxid Redox Signal **13**(9): 1359-1373.

Erl, W. (2005). "Statin-induced vascular smooth muscle cell apoptosis: a possible role in the prevention of restenosis?" Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord **5**(2): 135-144.

Eskes, R., B. Antonsson, A. Osen-Sand, S. Montessuit, C. Richter, R. Sadoul, G. Mazzei, A. Nichols and J. C. Martinou (1998). "Bax-induced cytochrome C release from mitochondria is independent of the permeability transition pore but highly dependent on Mg²⁺ ions." J Cell Biol **143**(1): 217-224.

España, E., J. H. Nam, E. J. Song, D. Song, C. K. Lee and J. K. Kim (2019). "Lipophilic statins inhibit Zika virus production in Vero cells." Sci Rep **9**(1): 11461.

Failli, V., M. A. Kopp, C. Gericke, P. Martus, S. Klingbeil, B. Brommer, I. Laginha, Y. Chen, M. J. DeVivo, U. Dirnagl and J. M. Schwab (2012). "Functional neurological recovery after spinal cord injury is impaired in patients with infections." Brain **135**(Pt 11): 3238-3250.

Forman, H. J., H. Zhang and A. Rinna (2009). "Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis." Mol Aspects Med **30**(1-2): 1-12.

Gerencsér, L., G. Laczkó and P. Maróti (1999). "Unbinding of oxidized cytochrome c from photosynthetic reaction center of Rhodobacter sphaeroides is the bottleneck of fast turnover." Biochemistry **38**(51): 16866-16875.

Giacomello, M., I. Drago, P. Pizzo and T. Pozzan (2007). "Mitochondrial Ca²⁺ as a key regulator of cell life and death." Cell Death Differ **14**(7): 1267-1274.

Gomez, B., Jr. and N. C. Robinson (1999). "Phospholipase digestion of bound cardiolipin reversibly inactivates bovine cytochrome bc1." Biochemistry **38**(28): 9031-9038.

- Guan, B., R. Chen, M. Zhong, N. Liu and Q. Chen (2020). "Protective effect of Oxymatrine against acute spinal cord injury in rats via modulating oxidative stress, inflammation and apoptosis." Metab Brain Dis **35**(1): 149-157.
- Gupte, S. S. and C. R. Hackenbrock (1988). "The role of cytochrome c diffusion in mitochondrial electron transport." J Biol Chem **263**(11): 5248-5253.
- Hackenbrock, C. R., B. Chazotte and S. S. Gupte (1986). "The random collision model and a critical assessment of diffusion and collision in mitochondrial electron transport." J Bioenerg Biomembr **18**(5): 331-368.
- Haines, T. H. and N. A. Dencher (2002). "Cardiolipin: a proton trap for oxidative phosphorylation." FEBS Lett **528**(1-3): 35-39.
- Hampton, M. B., B. Zhivotovsky, A. F. Slater, D. H. Burgess and S. Orrenius (1998). "Importance of the redox state of cytochrome c during caspase activation in cytosolic extracts." Biochem J **329** (Pt 1)(Pt 1): 95-99.
- Hancock, J. T., R. Desikan and S. J. Neill (2001). "Does the redox status of cytochrome C act as a fail-safe mechanism in the regulation of programmed cell death?" Free Radic Biol Med **31**(5): 697-703.
- Henze, K. and W. Martin (2003). "Essence of mitochondria." Nature **426**(6963): 127-128.
- Hofmeyr, G. J., T. A. Lawrie, N. Atallah Á and M. R. Torloni (2018). "Calcium supplementation during pregnancy for preventing hypertensive disorders and related problems." Cochrane Database Syst Rev **10**(10): Cd001059.
- Hosseini Siyanaki, M. R., B. Lucke-Wold and M. Khan (2022). "Exploration of treatments for subarachnoid hemorrhage." J Biomed Res (Middlet) **3**(1): 48-55.
- Hou, S., T. M. Saltos, I. W. Iredia and V. J. Tom (2018). "Surgical techniques influence local environment of injured spinal cord and cause various grafted cell survival and integration." J Neurosci Methods **293**: 144-150.
- Irwin, J. C., S. Khalesi, A. S. Fenning and R. K. Vella (2018). "The effect of lipophilicity and dose on the frequency of statin-associated muscle symptoms: A systematic review and meta-analysis." Pharmacol Res **128**: 264-273.
- Jeneson, J. A., J. P. Schmitz, N. M. van den Broek, N. A. van Riel, P. A. Hilbers, K. Nicolay and J. J. Prompers (2009). "Magnitude and control of mitochondrial sensitivity to ADP." Am J Physiol Endocrinol Metab **297**(3): E774-784.

Jeon, C. Y., S. J. Pandol, B. Wu, G. Cook-Wiens, R. A. Gottlieb, C. N. Merz and M. T. Goodman (2015). "The association of statin use after cancer diagnosis with survival in pancreatic cancer patients: a SEER-medicare analysis." PLoS One **10**(4): e0121783.

Jeong, S. H., H. S. Lee, S. J. Chung, H. S. Yoo, J. H. Jung, K. Baik, Y. H. Lee, Y. H. Sohn and P. H. Lee (2021). "Effects of statins on dopamine loss and prognosis in Parkinson's disease." Brain **144**(10): 3191-3200.

Jiang, X. and X. Wang (2004). "Cytochrome C-mediated apoptosis." Annu Rev Biochem **73**: 87-106.

Johnson, J., E. Mercado-Ayon, Y. Mercado-Ayon, Y. N. Dong, S. Halawani, L. Ngaba and D. R. Lynch (2021). "Mitochondrial dysfunction in the development and progression of neurodegenerative diseases." Arch Biochem Biophys **702**: 108698.

Kagan, V. E., G. G. Borisenko, Y. Y. Tyurina, V. A. Tyurin, J. Jiang, A. I. Potapovich, V. Kini, A. A. Amoscato and Y. Fujii (2004). "Oxidative lipidomics of apoptosis: redox catalytic interactions of cytochrome c with cardiolipin and phosphatidylserine." Free Radic Biol Med **37**(12): 1963-1985.

Kalpage, H. A., V. Bazylianska, M. A. Recanati, A. Fite, J. Liu, J. Wan, N. Mantena, M. H. Malek, I. Podgorski, E. I. Heath, A. Vaishnav, B. F. Edwards, L. I. Grossman, T. H. Sanderson, I. Lee and M. Hüttemann (2019). "Tissue-specific regulation of cytochrome c by post-translational modifications: respiration, the mitochondrial membrane potential, ROS, and apoptosis." Faseb j **33**(2): 1540-1553.

Kato, S., S. Smalley, A. Sadarangani, K. Chen-Lin, B. Oliva, J. Brañes, J. Carvajal, R. Gejman, G. I. Owen and M. Cuello (2010). "Lipophilic but not hydrophilic statins selectively induce cell death in gynaecological cancers expressing high levels of HMGCoA reductase." J Cell Mol Med **14**(5): 1180-1193.

Katsiki, N., K. Tziomalos, Y. Chatzizisis, M. Elisaf and A. I. Hatzitolios (2010). "Effect of HMG-CoA reductase inhibitors on vascular cell apoptosis: beneficial or detrimental?" Atherosclerosis **211**(1): 9-14.

Kaufmann, P., M. Török, A. Zahno, K. M. Waldhauser, K. Brecht and S. Krähenbühl (2006). "Toxicity of statins on rat skeletal muscle mitochondria." Cell Mol Life Sci **63**(19-20): 2415-2425.

Kjell, J. and L. Olson (2016). "Rat models of spinal cord injury: from pathology to potential therapies." Dis Model Mech **9**(10): 1125-1137.

- Kruger, N. J. (1994). "The Bradford method for protein quantitation." Methods Mol Biol **32**: 9-15.
- Kukor, Z. and M. Tóth (1994). "Ca(2+)-dependent and Ca(2+)-independent NO-synthesizing activities of human primordial placenta." Acta Physiol Hung **82**(4): 313-319.
- Kukor, Z. and S. Valent (2010). "[Nitric oxide and preeclampsia]." Orv Hetil **151**(52): 2125-2135.
- Lampé, R. (2012). "[Superoxide-anion production by neutrophil granulocytes in healthy and preeclamptic pregnant women]." Orv Hetil **153**(11): 425-434.
- Lash, L. H. (2006). "Mitochondrial glutathione transport: physiological, pathological and toxicological implications." Chem Biol Interact **163**(1-2): 54-67.
- Li, X., L. Sheng, L. Liu, Y. Hu, Y. Chen and L. Lou (2020). "Statin and the risk of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis B virus or hepatitis C virus infection: a meta-analysis." BMC Gastroenterol **20**(1): 98.
- Liu, B., Z. Yi, X. Guan, Y. X. Zeng and F. Ma (2017). "The relationship between statins and breast cancer prognosis varies by statin type and exposure time: a meta-analysis." Breast Cancer Res Treat **164**(1): 1-11.
- Lo, J., L. Chan and S. Flynn (2021). "A Systematic Review of the Incidence, Prevalence, Costs, and Activity and Work Limitations of Amputation, Osteoarthritis, Rheumatoid Arthritis, Back Pain, Multiple Sclerosis, Spinal Cord Injury, Stroke, and Traumatic Brain Injury in the United States: A 2019 Update." Arch Phys Med Rehabil **102**(1): 115-131.
- Lorach, H., A. Galvez, V. Spagnolo, F. Martel, S. Karakas, N. Interling, M. Vat, O. Faivre, C. Harte, S. Komi, J. Ravier, T. Collin, L. Coquoz, I. Sakr, E. Baaklini, S. D. Hernandez-Charpak, G. Dumont, R. Buschman, N. Buse, T. Denison, I. van Nes, L. Asboth, A. Watrin, L. Struber, F. Sauter-Starace, L. Langar, V. Auboiroux, S. Carda, S. Chabardes, T. Aksenova, R. Demesmaeker, G. Charvet, J. Bloch and G. Courtine (2023). "Walking naturally after spinal cord injury using a brain-spine interface." Nature.
- Luisetto, G. and V. Camozzi (2009). "Statins, fracture risk, and bone remodeling." J Endocrinol Invest **32**(4 Suppl): 32-37.

- Marí, M., E. de Gregorio, C. de Dios, V. Roca-Agujetas, B. Cucarull, A. Tutusaus, A. Morales and A. Colell (2020). "Mitochondrial Glutathione: Recent Insights and Role in Disease." Antioxidants **9**(10): 909.
- Mattucci, S., J. Speidel, J. Liu, M. S. Ramer, B. K. Kwon, W. Tetzlaff and T. R. Oxland (2019). "Development of a traumatic cervical dislocation spinal cord injury model with residual compression in the rat." J Neurosci Methods **322**: 58-70.
- Minakov, A. N., A. S. Chernov, D. S. Asutin, N. A. Konovalov and G. B. Telegin (2018). "Experimental Models of Spinal Cord Injury in Laboratory Rats." Acta Naturae **10**(3): 4-10.
- Morin, D., F. Pires, C. Plin and J. P. Tillement (2004). "Role of the permeability transition pore in cytochrome C release from mitochondria during ischemia-reperfusion in rat liver." Biochem Pharmacol **68**(10): 2065-2073.
- Murinson, B. B., N. J. Haughey and N. J. Maragakis (2012). "Selected statins produce rapid spinal motor neuron loss in vitro." BMC Musculoskeletal Disorders **13**(1): 100.
- Olmastroni, E., G. Molari, N. De Beni, O. Colpani, F. Galimberti, M. Gazzotti, A. Zambon, A. L. Catapano and M. Casula (2022). "Statin use and risk of dementia or Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis of observational studies." Eur J Prev Cardiol **29**(5): 804-814.
- Ott, M., J. D. Robertson, V. Gogvadze, B. Zhivotovsky and S. Orrenius (2002). "Cytochrome c release from mitochondria proceeds by a two-step process." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(3): 1259-1263.
- Pan, Z., D. W. Voehringer and R. E. Meyn (1999). "Analysis of redox regulation of cytochrome c-induced apoptosis in a cell-free system." Cell Death Differ **6**(7): 683-688.
- Pánczél, Z., Z. Kukor, D. Supák, B. Kovács, A. Kecskeméti, R. Czizel, M. Djurecz, B. Alasztics, K. B. Csomó, A. Hrabák and S. Valent (2019). "Pravastatin induces NO synthesis by enhancing microsomal arginine uptake in healthy and preeclamptic placentas." BMC Pregnancy Childbirth **19**(1): 426.
- Pánczél, Z., D. Supák, B. Kovács, Z. Kukor and S. Valent (2020). "[Effect of pravastatin on tetrahydrobiopterin-sensitive and -resistant NO synthase activity of preeclamptic placentas]." Orv Hetil **161**(10): 389-395.
- Pastore, A., G. Federici, E. Bertini and F. Piemonte (2003). "Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification." Clin Chim Acta **333**(1): 19-39.

- Pervaiz, S. and M. V. Clément (2002). "A permissive apoptotic environment: function of a decrease in intracellular superoxide anion and cytosolic acidification." Biochem Biophys Res Commun **290**(4): 1145-1150.
- Radak, D., N. Katsiki, I. Resanovic, A. Jovanovic, E. Sudar-Milovanovic, S. Zafirovic, S. A. Mousad and E. R. Isenovic (2017). "Apoptosis and Acute Brain Ischemia in Ischemic Stroke." Curr Vasc Pharmacol **15**(2): 115-122.
- Ribas, V., C. García-Ruiz and J. C. Fernández-Checa (2014). "Glutathione and mitochondria." Front Pharmacol **5**: 151.
- Riesen, W. F. (2022). "[Pleiotropic Effects of Statins - What Is Their Clinical Significance?]." Praxis (Bern 1994) **110**(2): 86-88.
- Röhlich, P. (2006). "Szövektan." Semmelweis Kiadó és Multimédia Stúdió.
- Ruprecht, J. J. and E. R. S. Kunji (2021). "Structural Mechanism of Transport of Mitochondrial Carriers." Annu Rev Biochem **90**: 535-558.
- Sahebkar, A., N. Kiaie, A. M. Gorabi, M. R. Mannarino, V. Bianconi, T. Jamialahmadi, M. Pirro and M. Banach (2021). "A comprehensive review on the lipid and pleiotropic effects of pitavastatin." Prog Lipid Res **84**: 101127.
- Sahin-Tóth, M., Z. Kukor and M. Tóth (1997). "Tetrahydrobiopterin preferentially stimulates activity and promotes subunit aggregation of membrane-bound calcium-dependent nitric oxide synthase in human placenta." Mol Hum Reprod **3**(4): 293-298.
- Sanders, R., A. Konijnenberg, H. J. Huijgen, H. Wolf, K. Boer and G. T. Sanders (1999). "Intracellular and extracellular, ionized and total magnesium in pre-eclampsia and uncomplicated pregnancy." Clin Chem Lab Med **37**(1): 55-59.
- Sanders, S. P., S. J. Harrison, P. Kuppusamy, J. T. Sylvester and J. L. Zweier (1994). "A comparative study of EPR spin trapping and cytochrome c reduction techniques for the measurement of superoxide anions." Free Radic Biol Med **16**(6): 753-761.
- Schlame, M., S. Brody and K. Y. Hostetler (1993). "Mitochondrial cardiolipin in diverse eukaryotes. Comparison of biosynthetic reactions and molecular acyl species." Eur J Biochem **212**(3): 727-735.
- Schmeer, C., A. Kretz and S. Isenmann (2006). "Statin-mediated protective effects in the central nervous system: general mechanisms and putative role of stress proteins." Restor Neurol Neurosci **24**(2): 79-95.

- Sprügel, M. I., J. B. Kuramatsu, B. Volbers, J. I. Saam, J. A. Sembill, S. T. Gerner, S. Balk, H. M. Hamer, H. Lücking, P. Hölder, C. H. Nolte, J. F. Scheitz, A. Rocco, M. Endres and H. B. Huttner (2021). "Impact of Statins on Hematoma, Edema, Seizures, Vascular Events, and Functional Recovery After Intracerebral Hemorrhage." Stroke **52**(3): 975-984.
- Steegers, E. A., P. von Dadelszen, J. J. Duvekot and R. Pijnenborg (2010). "Pre-eclampsia." Lancet **376**(9741): 631-644.
- Taoka, Y. and K. Okajima (1998). "Spinal cord injury in the rat." Prog Neurobiol **56**(3): 341-358.
- Tóth, M., Z. Kukor and M. Sahin-Tóth (1997). "Activation and dimerization of type III nitric oxide synthase by submicromolar concentrations of tetrahydrobiopterin in microsomal preparations from human primordial placenta." Placenta **18**(2-3): 189-196.
- Wahlländer, A., S. Soboll, H. Sies, I. Linke and M. Müller (1979). "Hepatic mitochondrial and cytosolic glutathione content and the subcellular distribution of GSH-S-transferases." FEBS Lett **97**(1): 138-140.
- Wang, Y., W. Wang, M. Wang, J. Shi, X. Jia and S. Dang (2022). "A Meta-Analysis of Statin Use and Risk of Hepatocellular Carcinoma." Can J Gastroenterol Hepatol **2022**: 5389044.
- Williams, N. H. and J. K. Yandell (1985). "Reduction of oxidized cytochrome c by ascorbate ion." Biochim Biophys Acta **810**(2): 274-277.

Ábrajegyzék

1. ábra: Lipofil és hidrofil statinok. A statinok feloszthatóak hidrofil és lipofil statinokra, oldhatóságuk alapján. Az ábra Espano és munkatársai 2019-ben megjelent cikkében található ábra alapján készült. (Españo, Nam et al. 2019).....	12
2. ábra: A klasszikus gerincvelő sértési technika bemutatása. (A) A sebészi terület megnyitása. (B) Laminektómia (L1 csigolya). (C) Hemiszekció (4. lumbális szegmentum). Az ábrát Ángyán Gergely készítette.	21
3. ábra: A rajz mutatja a nyitott gerincvelős sértéses módszer lépéseit patkány esetében. (A) A feltárt csigolya. (B) A processus spinosusok eltávolítva (Th13 és L1). (C) Az L1-es csigolya felemelt és megdöntött csigolyaíve. (D) A jobb oldali hemiszekció, nagyítva a féloldalt átmetszett gerincvelő. Az ábrát Ángyán Gergely készítette.....	23
4. ábra: A citokróm c redukció glutation jelenlétében különböző pH-n. (1 mM glutation, 1 mM EDTA jelenlétében, 25 °C-on. 1/A ábrán pH=7,0; 7,4; és 8,0 (40 mM Tris/HCl mellett) látható. 1/B ábrán pH=6,0; 6,5 (40 mM NaHCO ₃ mellett); és 7,0 (40 mM Tris/HCl mellett); és 7,0 (40 mM Tris/HCl mellett) látható. A reakciók a citokróm c oldatokhoz történő hozzáadásával indultak.) (n = 6 ± SD)	27
5. ábra: A citokróm c redukció glutation jelenlétében, különböző Ca ²⁺ koncentrációk mellett. 100 µM szarvasmarha citokróm c, 1 mM glutation jelenlétében, 25 °C-on pH=8,0 (40 mM Tris/HCl) mellett. A méréseket 0-10 mM Ca ²⁺ koncentráció tartományban végeztük. A reakciók a citokróm c oldatokhoz történő hozzáadásával indultak. (n = 6 ± SD)	28
6. ábra: A citokróm c redukció glutation jelenlétében, különböző Mg ²⁺ koncentrációk mellett. 100 µM szarvasmarha citokróm c, 1 mM glutation jelenlétében, 25 °C-on, pH=8,0 (40 mM Tris/HCl) mellett. A méréseket 0-10 mM Mg ²⁺ koncentráció tartományban végeztük. A reakciók a citokróm c oldatokhoz történő hozzáadásával indultak. (n = 6 ± SD)	29
7. ábra: Tiolok hatása a citokróm c redukcióra. 100 µM szarvasmarha citokróm c, 1 mM glutation (GSH), 0,5 mM (1 mM tiol) ditiotreitol (DTT), valamint 1 mM cisztein (Cys) jelenlétében, 25 °C-on, pH=8,0 (40 mM Tris/HCl) mellett. A reakciók a citokróm c oldatokhoz történő hozzáadásával indultak. (n = 6 ± SD)	30

- 8. ábra:** Foszfolipidek hatása a citokróm c redukcióra, glutation jelenlétében. 100 μM szarvasmarha citokróm c, 1 mM glutation, 0,1 mM EDTA, 5 v/v% etanol (foszfolipid oldószer), 25 °C-on, pH=8,0 (40 mM Tris/HCl) mellett. 250 $\mu\text{g/ml}$ foszfátid sav (PA), 250 $\mu\text{g/ml}$ foszfátidil szerin (PS), 250 $\mu\text{g/ml}$ kardiolipin (CL) jelenlétében. A reakciók a citokróm c oldatokhoz történő hozzáadásával indultak. ($n = 6 \pm \text{SD}$) 31
- 9. ábra:** Mg^{2+} és Ca^{2+} és foszfolipidek hatása a citokróm c redukcióra, glutation jelenlétében. 100 μM szarvasmarha citokróm c, 1 mM glutation, 5 v/v% etanol (foszfolipid oldószer), 25 °C-on, pH=8,0 (40 mM Tris/HCl) mellett. 250 $\mu\text{g/ml}$ kardiolipin (CL), 250 $\mu\text{g/ml}$ kardiolipin és 1 mM Ca^{2+} (Ca, CL), 250 $\mu\text{g/ml}$ kardiolipin és 1 mM Mg^{2+} (Mg, CL), kontroll (kardiolipin, illetve Mg^{2+} és Ca^{2+} nélkül) (cont) jelenlétében. A reakciók a citokróm c oldatokhoz történő hozzáadásával indultak. ($n = 6 \pm \text{SD}$) 32
- 10. ábra:** A Mg^{2+} hatása a mitokondriális oxigénfogyasztásra. 100 μM szarvasmarha citokróm c, 80 mM KCl; 20 mM TRIS/HCl; 0,1 mM EGTA; 10 mM KH_2PO_4 ; pH 8.0 mellett; 37 °C-on; 5 mM GSH jelenlétében; 1 mg mitokondriális fehérje/ml. Alkalmazott Mg^{2+} koncentrációk: 0,2 mM, 1 mM, 10 mM. A ** közepes szignifikáns különbséget ($p < 0,01$), a *** erősen szignifikáns különbséget ($p < 0,001$) jelez. 33
- 11. ábra:** A Ca^{2+} hatása a mitokondriális oxigénfogyasztásra. 100 μM szarvasmarha citokróm c, 80 mM KCl; 20 mM TRIS/HCl; 0,1 mM EGTA; 10 mM KH_2PO_4 ; pH 8.0 mellett; 37 °C-on; 5 mM GSH jelenlétében; 1 mg mitokondriális fehérje/ml. Alkalmazott Ca^{2+} koncentrációk: 0,2 mM, 1 mM, 10 mM. A *** erősen szignifikáns különbséget ($p < 0,001$) jelez. 34
- 12. ábra:** A pravastatin és a simvastatin hatása a citokróm c redukcióra. 100 μM szarvasmarha citokróm c, 1 mM EDTA, 1 mM glutation, 100 mM Tris/HCl (pH=8,0), 25 °C-on. A mérések szignifikáns különbséget ($p < 0,05$) mutatnak. A * szignifikáns különbséget ($p < 0,05$) jelez. 35
- 13. ábra:** A pravastatin és a simvastatin hatása a citokróm c redukcióra, Mg^{2+} jelenlétében. 100 μM szarvasmarha citokróm c, 1 mM glutation, 1 mM Mg^{2+} , 100 mM Tris/HCl (pH=8,0), 25 °C-on. Cont: kontroll pravastatin és simvastatin nélkül; Pra: 100 μM pravastatin; Sim: 100 μM simvastatin. A * szignifikáns különbséget ($p < 0,05$) jelez. 36

14. ábra: A pravastatin és a simvastatin hatása a citokróm c redukcióra, kardirolipin jelenlétében, Mg^{2+} nélkül és 1mM Mg^{2+} jelenlétében. 100 μ M szarvasmarha citokróm c, 100 mM Tris/HCl (pH=8,0), 1mM Mg^{2+} (Mg), 1mM EDTA (EDTA). Cont: kontroll pravastatin és simvastatin nélkül; CL: 200 μ g/ml kardirolipin; CL, Pra: 200 μ g/ml kardirolipin, 100 μ M pravastatin; CL, Sim: 200 μ g/ml kardirolipin, 100 μ M simvastatin. A * szignifikáns különbséget ($p<0,05$) jelez.....	37
15. ábra: A pravastatin és simvastatin hatása a mitokondriális oxigénfogyasztásra. 1 mM Mg^{2+} ; pH 8.0 mellett; 37 °C-on; 1 mM GSH jelenlétében; 1 mg mitokondriális fehérje/ml. Pra: 100 μ M pravastatin; Sim: 100 μ M simvastatin. A csillag szignifikáns különbséget ($p<0,05$) jelez.	38
16. ábra: Az eltávolított, hemiszekción átesett gerincvelő ventralis és dorsalis nézete. Az egészben eltávolított gerincvelő ventralis (A) és dorsalis nézete (B).....	40
17. ábra: Hemiszekció szövettani minta. A hisztológiai minta hematoxin-eozinnal festve, a féloldali átmetszést mutatja, 16x nagyítású felvétel. 1 mm-es lépték jelezve.	41
18. ábra: pH 6,0 mellett, illetve Ca^{2+} és Mg^{2+} hiányában a citokróm c nem képes a glutation oxidációjára. pH= 8,0, illetve 1 mM Ca^{2+} , vagy Mg^{2+} mellett a citokróm c disszociál a belső membránról, és képessé válik a glutation oxidálására, ahonnan a felvett elektron a IV. komplexhez juttatja, az átadott elektron ATP előállítására használdik fel. Viszont 10 mM Ca^{2+} , vagy Mg^{2+} mellett a citokróm c képessé válik a mitokondrium elhagyására.	47
19. ábra: A statinok hatásának szemléltetése vizsgálataink alapján. Alacsony magnézium szint mellett sem a simvastatin (sim), sem a pravastatin (pra) nem képes a citokróm c (cit c) működésének befolyásolására, így a citokróm c a III. és a IV. komplex közötti elektrontranszportot végzi. A Mg^{2+} szint emelkedése esetén a simvastatin felgyorsítja a glutation (GSH) átalakulását oxidált glutationná (GSSG), mely a mitokondrium oxigénfogyasztását megemeli.....	52

9. Saját publikációk jegyzéke

A disszertáció alapját képező publikációk:

Csomó, K. B. ; Alasztics, B. ; Sándor, A. P. ; Belik, A. A. ; Varga, G. ; Hrabák, A. ; Kukor, Z.:

Characterization of oxidation of glutathione by cytochrome c

Journal of bioenergetics and biomembranes (2021)

Csomó, Krisztián B. ; Varga, Gábor ; Belik, Andrea A. ; Hricisák, László ; Borbély, Zoltán ; Gerber, Gábor

A Minimally Invasive, Fast Spinal Cord Lateral Hemisection Technique for Modeling Open Spinal Cord Injuries in Rats

JOVE-JOURNAL OF VISUALIZED EXPERIMENTS : 181 Paper: 63534 (2022)

Csomó K, Belik A, Hrabák A, Kovács B, Fábián O, Valent S, Varga G, Kukor Z.:
Effect of Pravastatin and Simvastatin on the Reduction of Cytochrome C.

Journal of Personalized Medicine (2022)

A disszertáció alapját nem képező publikációk:

Borbély Z, Csomó BK, Kittel Á, Gerber G, Varga G, Vizi ES.:

Effect of rat spinal cord injury (hemisection) on the ex vivo uptake and release of noradrenaline from a slice preparation. *Brain Res Bull.* 131:150-155. (2017)

Kálló K, Perczel-Kovács K, Kerémi B, Nagy K, Rácz R, Csomó KB, Farkasdi S, Kádár K, Varga R, Blazsek J, Varga G.:

The Effect Mesenchymal Stem Cells of Dental Pulp Origin on Osseointegration of Mini Implants into Rat Tail Vertebrae. *Digestive Diseases and Sciences* 59(8):1657-1657 (2014)

Szabó BT, Aksoy S, Repassy G, Csomo K, Dobo-Nagy C, Orhan K.:

Comparison of hand and semiautomatic tracing methods for creating maxillofacial artificial organs using sequences of computed tomography (CT) and cone beam computed tomography (CBCT) images. *Int J Artif Organs*. 40(6):307-312. (2017)

Vingender S; Restar L; Csomo KB; Schmidt P; Hermann P; Vaszilko M.:
Az állkapocsízületi károsodás kezelése szteroiddal, illetve hialuronsavval.
Orvosi Hetilap 159: 36 pp. 1475-1482., 8p. (2018)

Brody A; Zalatnai A; Csomo K; Belik A; Dobo-Nagy Cs.:
Difficulties in the diagnosis of periapical translucencies and in the classification of cemento-osseous dysplasia. *BMC Oral Health* 19:139 (2019)

Lang O.; Kohidai L.; Kohidai Zs.; Dobo-Nagy Cs.; Csomo K. B.; Lajko M.; Mozes M.; Keki S.; Deak Gy.; Tian Kun V., Gresz V.:
Cell physiological effects of glass ionomer cements on fibroblast cells.
Toxicology in Vitro paper: 104627 (2019)

Pánczél, Zita; Kukor, Zoltán; Supák, Dorina; Kovács, Bence; Kecskeméti, András;
Czizel, Rita; Djurecz, Magdolna; Alasztics, Bálint; Csomó, Krisztián Benedek;
Hrabák, András:
Pravastatin induces NO synthesis by enhancing microsomal arginine uptake in healthy and preeclamptic placentas.
BMC Pregnancy and Childbirth 19: 1 Paper: 426 , 9 p. (2019)

Koppány, Ferenc; Joób-Fancsaly, Árpád; Németh, Zsolt; Alexandra Belik, Andrea;
Vaszilkó, Mihály; Márton Varmuzsa, Edvárd; Benedek Csomó, Krisztián:
A biszfoszfonátkezelés állcsontnekrózist előidéző kockázatának megítélése CBCT-felvételek alapján.
Orvosi Hetilap 161: 21 pp. 867-872., 6 p. (2020)

Papp, Zs K ; Szmirnov, Gy ; Csomó, K. ; Iványi, A ; Joób-Fancsaly, Á:
Az életkor szerepének retrospektív vizsgálata a bölcsességfogak eltávolításában

Fogorvosi szemle 113 : 4 pp. 116-122., 7 p. (2020)

Csurgay, Katalin ; Zalatnai, Attila ; Benczik, Márta ; Csomó, Benedek
Krisztián ; Horváth, Ferenc ; Lőrincz, Ádám ; Komlós, György ; Németh Zsolt:
A Study of Prognostic Factors in Young Patients With Non-HPV Oral Cancer in
Central Europe

Pathology and oncology research 27 Paper: 1609991, 11 p. (2021)

Koppány, Ferenc ; Csomó, Krisztián Benedek ; Varmuzsa, Edvárd Márton ; Bognár,
Eszter ; Pelyhe, Liza ; Nagy, Péter ; Kientzl, Imre ; Szabó, Dániel ; Weszl, Miklós ;
Dobos, Gábor ; Lenk, Sándor ; Erdei, Gábor; Kiss, Gábor; Nagy, Lilien; Sréter, Attila;
Belik, Andrea Alexandra; Tóth, Zsuzsanna; Vág, János; Joób-Fancsaly, Árpád;
Németh, Zsolt.:

Enhancement of Hydrophilicity of Nano-Pitted TiO₂ Surface Using Phosphoric Acid
Etching

NANOMATERIALS 13 : 3 Paper: 511 , 9 p. (2023)

10. Köszönetnyilvánítás:

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, Dr. Kukor Zoltánnak, a rengeteg segítségével, iránymutatásáért és barátságáért az elmúlt 18 év során; prof. Dr. Varga Gábornak, különösen azért, hogy nem veszítette el a bizalmát és mindig segített. Szeretném megköszönni konzulensemnek, Dr. Gerber Gábornak rengeteg segítségét, és munkáját, melynek köszönhetően ki tudtunk fejleszteni egy új kísérleti módszert.

Köszönöm a kitartást szüleimnek, akik végtelen türelmükkel, segítségükkel a kutatómunkámat lehetővé tették.

Feleségemnek rengeteg hálával tartozom, a folyamatos szakértő segítségével, munkájáért, türelméért, Nélküle mindez nem születhetett volna meg.

Minden kollegámnak, barátomnak szeretnék köszönetet mondani, segítségéért, türelméért.

És végül, de a legkevésbé sem utolsó sorban köszönöm gyermekeimnek, hogy néha hagytak dolgozni.