

A mitokondriális citokróm c vizsgálata és metodikai fejlesztés.

Doktori tézisek

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

Bevezetés

Vizsgálataink során szerettük 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 gyógyszercsalád 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. Mindezek miatt tartjuk fontosnak a statinok hatásmechanizmusainak mélyebb megismerését.

Kutatócsoportunk számára különösen érdekes volt ez a gyógyszercsoport és mellékhatásaik, 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.

Tervezzük neurális sérülés esetében a mitokondriális citokróm c működésének változását és a statinok apoptózist indukáló hatását vizsgálni. Ehhez ideális modell a gerincvelő sértéses beavatkozás, melynek a vizsgálathoz történő adaptációja megkívánja annak finomítását.

Célkitűzések

1. célkitűzés: Megvizsgálni, hogy a membránkött és szabad citokróm c redukciója glutationnal hogyan változik a pH függvényében.
2. célkitűzés: 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.
3. célkitűzés: Megvizsgálni, hogy simvastatin és pravastatin hatására megváltozik-e a citokróm c redukció sebessége glutation jelenlétében.
4. célkitűzés: Annak vizsgálata, hogy a glutation lehet-e a mitokondrium légzési szubsztrátja.
5. célkitűzés: A pravastatin és simvastatin befolyásolhatja-e a mitokondrium oxigénfogyasztását glutation jelenlétében?

6. célkitűzés: A pravastatin és a simvastatin célpontja lehet-e a citokróm c?

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

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

Eredmények

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.

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.

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

4. célkitűzés értékelése (glutation, mint légzési szubsztrát vizsgálata): Sikerült igazolnunk, hogy a mitokondrium légzési szubsztrátjaként funkcionálhat a glutation. Modellünk szerint a citokróm c membránköthető 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.

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. 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.

7. célkitűzés értékelése (gerincvelő sértési protokoll minimálinvazívításának vizsgálata):

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

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

Összefoglalás, Summary

Vizsgálataink során szeretnénk 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.

Saját publikációk jegyzéke

Disszertációhoz kapcsolódó közlemények

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, Fábíán O, Valent S, Varga G, Kukor Z.:
Effect of Pravastatin and Simvastatin on the Reduction of Cytochrome C.
Journal of Personlized Medicine (2022)

A disszertáció alapját nem képező publikációk:

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)

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)

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. et al.:

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; Vaszilko, 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 et al.:
Enhancement of Hydrophilicity of Nano-Pitted TiO₂ Surface Using Phosphoric Acid Etching
NANOMATERIALS 13 : 3 Paper: 511 , 9 p. (2023)

Szmirnova, I. ; Szmirnov, G. ; Haba, N. ; Csomo, K. ; Nemeth,Z.; Szabo, G. Az értelmi fogyatékkal élők fogászati kezelése és prevenció lehetőségei napjainkban
ORVOSI HETILAP 164 : 37 pp. 1456-1461. , 6 p. (2023)