

**A mitokondriális funkciózavar patomechanizmusa és terápiás lehetőségei  
iszkémia-reperfúzióban**

**Strifler Gerda**

Ph.D. értekezés tézisei

**Szegedi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar  
Multidiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola**

**Szegedi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Sebészeti Műtéttani Intézet**



**Témavezető: Dr. Hartmann Petra**

**Szeged**

**2016**

### **Az értekezés alapjául szolgáló közlemények**

**Strifler G**, Tuboly E, Szél E, Kaszonyi E, Cao C, Kaszaki J, Mészáros A, Boros M, Hartmann P. Inhaled methane limits the mitochondrial electron transport chain dysfunction during experimental liver ischemia-reperfusion injury. PLoS ONE 11:(1) Paper e0146363. (2016) **IF: 3,057\***

**Strifler G**, Tuboly E, Görbe A, Boros M, Hartmann P. Targeting mitochondrial dysfunction with L-alpha glycerylphosphorylcholine. PLoS ONE 11(11):e0166682. (2016) **IF: 3,057\***

**Strifler G**, Mészáros A, Pécz D, Ficzeré Á, Baráth B, Boros M, Hartmann P. A májfunkció vizsgálata respirometriával. *MAGYAR SEBÉSZET (közlésre elfogadva)*

### **Az értekezés alapjául szolgáló előadás kivonatok**

**Strifler G**, Tuboly E, Szél E, Kaszonyi E, Cao C, Kaszaki J, Mészáros A, Boros M, Hartmann P. Inhaled Methane limits the mitochondrial electron transport chain dysfunction during experimental liver ischemia-reperfusion injury. EUROPEAN SURGICAL RESEARCH 55:(Suppl. 1.) Paper OP-12. (2015)

**Strifler G**, Fehér Á, Kaszonyi E, Gowda A, Kaszaki J, Boros M, Hartmann P. Metánlélegeztetés májmitokondriumokra gyakorolt hatása részleges máj ischaemia-reperfúziós károsodásban patkányokban. *MAGYAR SEBÉSZET* 68:(3) p. 115. (2015)

**Strifler G**, Hartmann P, Mészáros A, Kaszonyi E, Cao C, Kaszaki J, Boros M. Effects of methane inhalation on rat liver mitochondria following partial hepatic ischemia. *ACTA PHYSIOLOGICA* 211:(S697) p. 170. (2014)

### **Egyéb, teljes terjedelmű közlemények**

Szalai Z, Szász A, Nagy I, Puskás LG, Kupai K, Király A, Magyariné Berkó A, Pósa A, **Strifler G**, Baráth Z, Nagy LI, Szabó R, Pávó I, Murlasits Z, Gyöngyösi M, Varga C. Anti-inflammatory effect of recreational exercise in TNBS induced colitis in rats: role of NOS/HO/MPO system. *OXIDATIVE MEDICINE AND CELLULAR LONGEVITY* 2014: Paper 925981. 11 p. (2014) **IF: 3,516**

Szasz A, **Strifler G**, Voros A, Vaczi B, Tubak V, Puskas LG, Belso N, Kemeny L, Nagy I. The expression of TAM receptors and their ligand Gas6 is downregulated in psoriasis. *JOURNAL OF DERMATOLOGICAL SCIENCE* 71:(3) pp. 215-216. (2013) **IF: 3,335**

**Összesített IF: 12,965**

## **I. BEVEZETÉS**

### **1.1. A mitokondriumok élettani szerepe**

A mitokondriumok a citoplazmában található sejtorganellek, elsődleges feladatuk a sejtek működéséhez szükséges energia előállítása. A belső mitokondriális membránban helyezkedik el a légzési lánc elektronátvivő rendszere, ahol a lánc fehérjekomplexei koenzimokkal együttműködésben elektronokat akceptálnak. A citromsav ciklusban képződő elektrondonor molekulákról leváló elektronok folyamatosan haladnak a komplexek fémionokat tartalmazó aktív centrumain keresztül, míg végül eléri az oxigénmolekulát, ahol víz kilépése mellett proton-elektromotoros erő keletkezik. A belső membrán két oldalán létrejött proton gradiens mentén visszaáramlanak a protonok a membránhoz kötött ATP szintetáz molekulán keresztül, és a felszabaduló energia segítségével ATP képződik (Li 2012).

### **1.2. A mitokondriális károsodás iszkémia-reperfúzióban (IR)**

A szöveti iszkémia alatt bekövetkező oxigénhiány következtében az ATP termelődése csökken, miközben hidrolízise fokozódik. A reperfúzió fázisában az újrainduló oxigénellátás azonban reaktív oxigén gyökök (ROS) képződéséhez és iszkémia-reperfúziós (IR) károsodáshoz vezet. A máj IR károsodása során igazolták, hogy a képződő ROS legfőbb forrásai az endotél sejtek és a hepatociták mitokondriumai (Hines 2003), főleg az I. és III. komplexeken (Kalashnyk 2012).

### **1.3. A mitokondriális funkció vizsgálata nagy felbontású respirometriával**

A respirométer a Clark elektród (bipoláris elektrokémiai oxigén szenzor) elvén működő mérőrendszer, amely nagy pontossággal képes biológiai minták pillanatnyi oxigénfogyasztásának meghatározására és követésére (Gnaiger 2000). Az általunk alkalmazott eszközrendszer (Oxygraph-2, Innsbruck, Ausztria) további jellegzetessége, hogy a mitokondrium légzési láncának komplexei működés közben szelektíven vizsgálhatóak és a változások valós időben követhetők. A kicsiny katódfelület, a zárt mintatartó és a minta keverése biztosítja, hogy a minta térfogatában az oxigén koncentráció állandó legyen, amit a katódon történő oxigénfogyasztás nem befolyásol, s ez adja az oxidatív foszforiláció, mint alapvető mitokondriális funkció vizsgálatának alapját. Az elektródot polipropilén membrán borítja, ami oxigénre és széndioxidra permeábilis, de nem ereszt át a vizet és az ionokat,

továbbá megakadályozza olyan vegyületek bejutását az elektródokhoz, melyek azokat károsíthatják, vagy a mérést zavarhatják.

#### **1.4. A gázmediátorok és a metán**

A nitrogénmonoxid, a szénmonoxid vagy a kénhidrogén élettani-kórtani szerepe igen fontos. Ezeket a gázokat a korábbiakban biológiailag inertnek tartották, de ma már jól ismert, hogy szabályozott enzimatikus útvonalakon képződve, saját molekuláris célpontjaik vannak. Bizonyos szempontok alapján ezek sorába illeszkedhet a metán (CH<sub>4</sub>). A CH<sub>4</sub> bioaktivitásra több adat utal, *in vivo* és *in vitro* kísérletes körülmények között befolyásolja a gasztrointesztinális (GI) rendszer motilitását (Roccarina 2010, Pimentel 2014), és korábbi állatkísérletes vizsgálatainkban kimutattuk, hogy exogén, normoxiás 2,5% CH<sub>4</sub> gázkeverék alkalmazása csökkenti az IR károsodást kísérő ROS képződést és a gyulladásos sejtek szöveti infiltrációját (Boros 2012). A CH<sub>4</sub> hatásmechanizmusáról kevés információ áll rendelkezésünkre, de antioxidáns és anti-apoptotikus hatását több vizsgálat megerősítette (Song 2015, Wu 2015, Ye 2015, Chen 2016, He 2016). Feltételeztük, hogy e jelenség hátterében a mitokondriális légzési aktivitás és ROS termelődés befolyásolása állhat.

#### **1.5. Az L-alfa-glicerilfoszforilkolin (GPC) biológiai hatásai**

A vízdékony deacilált foszfatidilkolin származék GPC a membránok foszfolipid szintézisének kolin-donora, hipoxiás folyamatokban szerepe lehet a foszfolipid homeosztázis fenntartásában (Brownawell 2011, Abbiati 1993, Parnetti 2001). A GPC gyulladásgátló tulajdonságú, csökkenti a központi idegrendszerben a membránkárosodást, elősegíti a máj ATP szint regenerálódását (Tőkés 2015), emellett korábbi vizsgálatainkban hatásosnak bizonyult a lipidperoxidáció és az IR károsodások kivédésére is (Hartmann 2014).

## **2. CÉLKITŰZÉSEK**

- Elsődleges célunk a máj IR károsodását kísérő mitokondriális funkcióváltozások jellemzése volt nagy felbontású respirometriával,
  - *in vitro* kísérletekben, izolált máj mitokondriumokon;
  - *in vivo* kísérletekben, kontroll állapotban és IR károsodást követően hasonlítottuk össze a mitokondriális elektrontranszportban bekövetkező változásokat.

- További célunk a máj IR alatt bekövetkező mitokondriális működészavar befolyásolása volt,
  - ennek során vizsgáltuk a normoxiás CH<sub>4</sub> belélegzés mitokondriális légzési aktivitásra gyakorolt hatását;
  - az exogén GPC mitokondriális funkciókra kifejtett hatását;
- Feltételeztük, hogy a CH<sub>4</sub> belélegzés és a GPC terápia hatásmechanizmusában is szerepet játszik a mitokondriális elektronátvivő rendszer működési zavarának csökkentése, ami által a következményes pro-inflammációs aktiváció befolyásolható.

### 3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Vizsgálatainkban részleges máj IR modellt alkalmaztunk altatott, hím Sprague-Dawley patkányok (átlagos súly 300±20g) felhasználásával, melyeket ellenőrzött körülmények között, 12 órás nappal-éjszaka ciklusban, laboratóriumi tápon tartottunk. Kísérleteinket az Állatkísérleti Tudományos Etikai Tanács (ÁTET) jóváhagyásával végeztük (Munkahelyi Állatjóléti Bizottság (MÁB) engedélyszám V/148/2013).

#### 3.1. Kísérleti csoportok és protokollok

Az állatokat Na-pentobarbitállal altattuk (45 mg kg<sup>-1</sup>, ip). A sebészi beavatkozás során medián laparotomiát végeztünk, amit kétoldali bordaívek alatti metszésekkel egészítettünk ki. A behatolási kapukból mobilizáltuk a májat, a v. portae hepatis ágait és az a. hepaticát.

Az IR mitokondriumokra gyakorolt hatásának vizsgálatához a részleges máj IR-t minden esetben ugyanúgy hoztuk létre: az a. hepatica és a v. portae hepatis bal ágainak leszorításával 60 perces bal májlebenyre terjedő teljes iszkémiát, majd felengedésével 60 perc reperfüziót értük el. Az álműtött állatok (SH) ugyanazon sebészeti eljáráson estek át, iszkémia indukálása nélkül.

A CH<sub>4</sub> máj mitokondriumokra gyakorolt hatásának vizsgálatához az állatokat 4 csoportba osztottuk. A 2,2%-os normoxiás CH<sub>4</sub> keverékkel történő lélegeztetést az iszkémia végén, a 50. perctől a reperfüzió végéig alkalmaztuk (SH+CH<sub>4</sub> és IR+CH<sub>4</sub> csoportokban), míg a másik két csoportban az állatok nem kaptak kezelést (SH és IR). A GPC máj mitokondriumokra gyakorolt hatásának vizsgálatához az állatokat szintén 4 csoportba osztottuk. Az IR+GPC csoport tagjai 16.56 mg/kg GPC iv. kezelést kaptak, 5 perccel a reperfüzió kezdete előtt. Az

álműtött állatok (SH) ugyanazon a sebészti eljáráson estek át iszkémia indukálása nélkül ugyanúgy, ahogy a másik kontroll csoport (SH+GPC).

### **3.2. Nagy felbontású respirometria**

A mitokondriális funkciók vizsgálatát nagy felbontású respirométerrel végeztük. Az *in vitro* vizsgálatokhoz a májmitokondriumokat Gnaiger módszere szerint izoláltuk (Gnaiger 2000). *In vivo* kísérleteinkhez májbiopsziákat vettünk különböző időpontokban. Különböző protokollokat alkalmaztunk: A légzési komplexekre specifikus szubsztrátok, inhibitorok és szétkapcsoló szerek (SUIT protokoll) használatával, hogy megvizsgáljuk az elektrontranszport rendszerben bekövetkezett változásokat. Először glutamát és malát szubsztrátok hozzáadásával aktiválni lehet az I. komplexet, majd indukáljuk az oxidatív foszforiláció folyamatát ADP-vel. Szukcinát hozzáadásával aktiválódik a II. komplex, ezáltal meghatározható az I. és II. komplex maximális aktivitása. Ha rotenonnal gátoljuk az I. komplexet, külön-külön mérhetővé válik az I. és a II. komplex kapacitása. Antimicin A hatására a III. komplex gátolódik. Végül elektrondonorokkal (aszkorbát/TMPD) aktiváljuk a IV. komplexet, amit nátrium-aziddal lehet gátolni. Az ún. "leak respiráció" mérésekor először a II. komplexhez kötött bazális respirációt 0.5  $\mu$ M I.-es komplex inhibitor rotenon és 10 mM szukcinát szubsztrát adásával határoztuk meg. A II.-es komplexhez kötött oxidatív foszforilációs kapacitást 2.5 mM ADP hozzáadása után határoztuk meg. Végül a leak respirációt (más néven state IV) határoztuk meg 0.5  $\mu$ M oligomycin hozzáadását követően.

### **3.3. Biokémiai és szövettani vizsgálmódszerek**

A citokróm-c-oxidáz aktivitását máj homogenizátumokból határoztuk meg (Szarka 2004). Máj homogenizátum felüliszójából fluorometriás módszerrel mértük a xantin-oxidoreduktáz (XOR) enzimaktivitását (Beckman 1989). Máj homogenizátumból NADPH-oxidáz aktivitást mértünk kemilumineszcenciás módszerrel (Bencsik 2010). A lipidperoxidáció bomlástermékeinek mérésére tiobarbitursavas módszerrel határoztuk meg a májminták malondialdehid (MDA) tartalmát (Placer 1966). A nitrogén monoxid stabil végtermékét, a szöveti nitrit/nitrát (NO<sub>x</sub>) szintet Griess reakcióval mértük (Purnak 2012).

A mieloperoxidáz (MPO) aktivitást a májszövet homogenizátum üledékéből határoztuk meg (Kuebler 1996).

A teljes vér szuperoxid és hidrogén-peroxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) meghatározása kemilumineszcenciás módszer segítségével történt (Ferdinandy 2000).

Redukált glutation (GSH) és oxidált glutation-diszulfid (GSSG) arányát máj homogenátban fluorimetriás módszerrel határoztuk meg (Zitka 2012).

Az *in vivo* szövettani vizsgálatokat lézer-szkenning konfokális mikroszkóppal, fluoreszcens jelölés alkalmazásával végeztük (Goetz 2011). A DNS fragmentáció kimutatására TUNEL próbát alkalmaztunk. Az apoptotikus sejtmagvakat DAPI festéssel tettük láthatóvá.

### **3.4. Statisztikai analízis**

Az adatokat a SigmaPlot 12.5 statisztikai szoftver (Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA) segítségével értékeltük ki. A csoportok közötti különbségek kimutatásához kétutas ANOVA-t, majd ezt követően Bonferroni post hoc tesztet használtunk a mitokondriális légzési funkciók, a mitokondriális citokróm-c kiáramlás valamint a teljes vér szuperoxid és H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> termelés meghatározására. Egyutas ANOVA-t, majd ezt követően Holm-Sidak post hoc tesztet alkalmaztunk a szöveti MDA, XOR, MPO és NADPH-oxidáz aktivitás meghatározására, valamint szöveti nitrit/nitrát, szuperoxid és H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> szint meghatározására. A TUNEL és DAPI festés statisztikai elemzésére Kruskal-Wallis és Dunn post hoc tesztet alkalmaztunk. A hisztológiai adatoknál a medián  $\pm$  standard deviáció (SD) értéket tüntettük fel, más adatok esetén a változásokat az átlag és az átlag szórásaként (mean  $\pm$  SEM) adtuk meg. A változásokat  $p < 0,05$  szint esetén tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

## **EREDMÉNYEK**

### **4.1. Az IR által indukált mitokondriális károsodás**

IR hatására jelentősen csökkent a légzési lánc kapacitása, vagyis az elektron transzport hatékonysága, valamint szignifikánsan alacsonyabb oxidatív foszforilációs kapacitás (120,7 $\pm$ 6,2 pmol/ml/sec vs 80,6 $\pm$ 2,8 pmol/ml/sec) volt észlelhető. A mitokondriumok kapcsoltsága romlott (140,9 $\pm$ 65,9 pmol/ml/sec vs 90,2 $\pm$ 3,09 pmol/ml/sec), ennek következtében a protonvesztést kompenzáló, ún. leak respiráció fokozódott, ami megnövekedett reaktív oxigén szabadgyök termelődésre és membrán károsodásra utalt. A légzési komplexek szelektív vizsgálata során a mitokondrium I-es komplexéhez kötött oxigén-fogyasztás mértéke szignifikánsan csökkent a kontroll csoporthoz képest (70,77 $\pm$ 2,39 pmol/ml/sec vs 40,9 $\pm$ 2,05 pmol/ml/sec). Ezek alapján az IR alatt kialakuló elektron transzportlánc zavara mögötti oki tényezőként, az I. komplex kiemelt szerepe igazolódott.

#### **4.2. A CH<sub>4</sub> mitokondriumra gyakorolt hatásai**

A II. komplex bazális respirációja szignifikánsan csökkent az IR csoportokban az iszkémia utolsó ötödik percénél, ezzel párhuzamosan alacsonyabb légzési kapacitást is mértünk a kontroll csoportokhoz képest. A CH<sub>4</sub> lélegeztetés hatására jelentősen javult a bazális respiráció (55,7±8,2 pmol/ml/sec vs 82,6±5,8 pmol/ml/sec). Ezzel összhangban, az IR-indukálta citokróm-c felszabadulással együtt a ROS termelés és a májsejt apoptózis is jelentősen csökkent. Eredményeinkből arra következtettünk, hogy az IR hatására megsérült a mitokondriális belső membrán, ami citokróm-c kiáramláshoz vezetett. Ezzel párhuzamosan romlott az elektrontranszportlánc működése, ami megmagyarázza a megnövekedett ROS termelődést. A CH<sub>4</sub> jótékony hatását a membránkárosodások kivédése és a citokróm-c mitokondriumokból történő kiáramlásának csökkentése révén érte el.

#### **4.3. A GPC mitokondriumra gyakorolt hatásai**

*In vitro* kísérleteket végeztünk annak érdekében, hogy megtudjuk van-e a GPC-nek dóziszfüggő hatása patkány máj mitokondriumok légzési aktivitására normoxiás és anoxiás körülmények között. Az 5-200 mM közötti koncentrációtartományban jótékony hatással bírt a mitokondriális oxigénfogyasztásra. A 200 mM-os koncentrációban szignifikánsan megnövelte az oxidatív foszforilációs kapacitást (160,8±12,2 pmol/ml/sec vs 390,7±24,8 pmol/ml/sec). Ezen túlmenően a GPC szignifikánsan csökkentette a 30 perces anoxia mitokondriumra gyakorolt káros hatásait.

Az *in vivo* kísérletekben az IR indukált mitokondriális károsodásokat a légzési komplexekre szelektív szubsztrát, gátlószer és szétkapcsolószerek adásával vizsgáltuk. Az IR hatására csökkent oxidatív foszforilációs kapacitást a GPC kezelés szignifikánsan javította az IR+GPC csoport állataiban. A GPC ezt a hatását az I. komplexhez kapcsolódó légzési aktivitás fokozásával fejtette ki.

#### **4.4. A CH<sub>4</sub> oxidatív károsodásra és szerkezeti változásra gyakorolt hatása**

A teljes vér szuperoxid és H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> termelő kapacitása szignifikánsan megemelkedett a reperfüziós időszakban az IR csoportban. A CH<sub>4</sub> lélegeztetés csökkentette a szabadgyökök termelődését. A szöveti MDA szint szignifikánsan magasabb volt a reperfüzió végén az IR csoportban, melyet a CH<sub>4</sub> lélegeztetés hatékonyan csökkentett. A bal májlebeny morfológiai



változásait *in vivo* lézer-szkenning konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk. FITC dextrán és akriflavin festéssel az IR csoportban tágult szinuszoidok valamint a májsejtek apoptózisára utaló szövettani jelek ábrázolódtak. A CH<sub>4</sub> lélegeztetés hatékonyan csökkentette ezeket a morfológiai változásokat. Mindössze néhány TUNEL pozitív sejt volt megfigyelhető az SH és SH+CH<sub>4</sub> csoportban, ezzel szemben IR következtében szignifikánsan megnövekedett a TUNEL pozitivitás, amelyet a CH<sub>4</sub> lélegeztetés szignifikánsan csökkentett.

#### **4.5. A GPC oxidatív károsodásra gyakorolt hatása**

Kísérleteink során IR hatására fokozódott a XOR enzim aktivitása, melyet a GPC alkalmazása szignifikánsan csökkentett. A 60 perces reperfúziós periódus végére megnövekedett a NADPH-oxidáz enzimaktivitás az IR csoportban, GPC alkalmazása után azonban ez az érték az álműtött állatokban mért érték szintjére csökkent. Az álműtött csoporthoz képest a szöveti MPO szint is szignifikánsan magasabb volt az IR csoportban, de GPC kezelés hatására ez szignifikánsan csökkent. A teljes vér szuperoxid és H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> termelő kapacitása megemelkedett a reperfúzió végén az IR csoportban, azonban az iszkémiás periódus végén alkalmazott GPC kezelés csökkentette a szuperoxid és H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> termelődését. Ahogyan várható volt, az IR csoportban megnövekedett MDA szintet detektáltunk. A GPC kezelés jelentősen csökkentette a szöveti MDA szintet, ugyanakkor nem volt megfigyelhető különbség a két kontroll csoport között (SH és SH+GPC). Az IR csoportban jelentősen emelkedett NO<sub>x</sub> szint volt mérhető a kontroll csoporthoz képest. A GPC alkalmazása csökkentette a NO<sub>x</sub> szintjét, de még így is magasabb maradt, mint az álműtött csoportban. GPC alkalmazása nem befolyásolta a GSSG szintet az álműtött állatokban. IR után jelentősen megemelkedett a GSSG szint és így csökkent a GSH/GSSG arány, ugyanakkor a GSSG szintje jelentősen csökkent a GPC kezelés hatására az IR+GPC csoportban. A GPC kezelés hatékonyan csökkentette az IR hatására létrejövő, szöveti károsodásra utaló változásokat is.

## **5. MEGBESZÉLÉS**

### **5.1. Az IR által okozott változások a mitokondriumok működésben**

Az IR hatására jelentősen csökkent a légzési lánc kapacitása, vagyis az elektron transzport hatékonysága, valamint alacsonyabb oxidatív foszforilációs kapacitás volt észlelhető. A mitokondriumok kapcsoltsága romlott, ennek következtében a protonvesztést kompenzáló, ún. leak respiráció fokozódott, ami megnövekedett reaktív oxigén szabadgyök

termelődésre és membránkárosodásra utalt. A légzési komplexek szelektív vizsgálatával az IR alatt kialakuló elektron transzportlánc zavara mögötti oki tényezőként, az I. komplex kiemelt szerepe igazolódott.

## **5.2. A CH<sub>4</sub> hatásai a mitokondriális károsodásra**

A megnövekedett CH<sub>4</sub> bevitel mitokondriális légzésre gyakorolt hatását *in vivo* kísérletekben, szabályozott lélegeztetés mellett vizsgáltuk. A 2,2 %-os CH<sub>4</sub>-tartalmú normoxiás levegő belélegeztetése megőrizte az oxidatív foszforilációs aktivitás kapacitását a szöveti iszkémia után, és jelentősen javította az alap mitokondriális légzési állapotot reperfüziót követően. Emellett az IR által okozott ROS termelés, a citokróm-c felszabadulás és a hepatociták apoptózisa is jelentős mértékben csökkent.

Iszkémia alatt a mitokondriális NADH/NAD<sup>+</sup> és FADH/FAD<sup>+</sup> arányok magasak maradtak, ezzel redukív stresszt okozva, a korábbi iszkémiás szövet reperfüziója pedig oxidatív stresszt okoz, nagymértékű ROS képződés mellett (Ghyczy 2008; Boros 1999). Az IR károsítja a heterogén lipid kettős réteg membránszerkezetét, és azt folyékonyról gél állagúra változtatja. A rendezetlen folyékony kettős réteg állapota így megfelel az elektrontranszport-lánc fizikai károsodásának (Carlisle 2005; Dougherty 1967). Kísérleteinkben a fokozott CH<sub>4</sub> bevitel hatására csökkent a ROS és az MDA szint is, így feltehetően kevésbé károsodott a mitokondriális membrán az IR okozta stresszt követően.

## **5.3. A GPC hatásai a ROS termelésre**

Az *in vitro* kísérleti adatok azt mutatják, hogy a GPC közvetlenül hat a mitokondriális oxigénfogyasztásra 5- és 200 mM-os koncentrációkban. A GPC alkalmazása csökkentette az anoxia okozta légzési következményeket azáltal, hogy csökkentette az elektronok szivárgását az intermembrán térbe. Ezt a hatást főként a GPC az I-es komplexre gyakorolt hatásnak tulajdoníthatjuk. A GPC valószínűleg megváltoztatja a fehérjék funkcióit és befolyásolja a redox állapotot is.

Kimutattuk, hogy az exogén GPC hatása az IR stressz során a mitokondriális oxidatív metabolizmust célozza, és bizonyítottuk, hogy az IR miatt kialakuló gyulladáisos folyamatok csökkenthetőek GPC alkalmazásával. Kísérleteink során GPC alkalmazásával alacsonyabb szintű leak respiráció mellett csökkent ROS termelés volt mérhető.

Vizsgáltuk az IR okozta elektrontranszport-láncban történő változásokat a XOR és NAPH oxidázokra adott válaszokkal együtt. A GPC hatására mindkét proinflammációs enzim

aktivitása csökkent. Továbbá az IR okozta megnövekedett szuperoxid- és hidrogén-peroxid képződés a keringő vérben megnövekedett lokális NO<sub>x</sub> koncentrációkkal társult, így közvetett bizonyítékként szolgálva a májszövetben bekövetkező oxido-nitrozatív stresszre.

Modellünkben a GPC alkalmazása jelentősen csökkentette az MDA szintjét és más oxidatív és nitrozatív stressz-markerek képződését is. Korábbi irodalmi adatok a celluláris GSH szint helyreállításának szükségességét hangsúlyozzák, vizsgálatunkban a GPC alkalmazása visszafordította az IR következtében kialakuló GSH szint csökkenést és fenntartotta a GSH/GSSG arányt. Ezen kívül az IR után megnövekedett MPO aktivitást is mérsékelte a GPC alkalmazása, utalva a csökkenő leukocita infiltrációra.

## 6. KÖVETKEZTETÉSEK

- A máj IR károsodása progresszív folyamat, ami abnormális ROS képződéshez, a mitokondriális membrán károsodásához, végül a mitokondrium funkciózavarához köthető apoptotikus sejthalálhoz vezet.
- Normoxiás 2,2%-os CH<sub>4</sub> belélegeztetése jelentősen javította az IR következtében kialakuló mitokondriális elektrontranszport zavart és csökkentette az ebből következő károsodások súlyosságát. A CH<sub>4</sub> szövetvédő tulajdonsága a csökkent mennyiségű citokrom-c felszabaduláshoz köthető, melynek következtében az apoptotikus hepatociták száma mérséklődött.
- GPC alkalmazása csökkentette az IR által okozott mitokondriális szabadgyök termelődést, ezt főként az I. komplexre gyakorolt hatásnak tulajdoníthatjuk.
- Exogén GPC a membránok lipidperoxidációjának mértékét, valamint a szövetkárosodást is jelentősen csökkenti, így hatékony szer lehet az IR következtében létrejövő májkárosodás kezelésére.
- Mind a CH<sub>4</sub>, mind a GPC alkalmazása a mitokondriális oxidatív metabolizmus befolyásolásán keresztül csökkenti az IR stressz után kialakuló proinflammációs aktivációt.

## **7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS**

Szeretném kifejezni hálámat Boros Mihály Professzor Úrnak, hogy lehetővé tette a tudományos munkám végzését a Szegedi Tudományegyetem Sebészeti Műtéttani Intézetében, valamint köszönöm Professzor Úrnak munkám szakmai irányítását.

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Hartmann Petrának, akitől az alapvető kutatói készségeket elsajátítottam, és külön köszönet a mindennapos segítségért, amit a kutatás, a konferenciákra való felkészülés, a publikációk és a doktori disszertáció megírása során kaptam.

Szeretném megköszönni a Sebészeti Műtéttani Intézet minden dolgozójának, hogy stabil háttérrel biztosítottak a kísérletekhez és biokémiai mérésekhez.

Köszönöm barátaimnak és ismerőseimnek, akik mellettem voltak az évek alatt és átsegítettek nehezebb időszakokon.

Végezetül nagyon hálás vagyok és köszönöm a családomnak a szeretetet és a gondoskodást, amivel támogattak, hogy elérjem a céljaimat.

## **8. TÁMOGATÁS**

A kutatás a (OTKA) K104656, NKFI K120232 és a GINOP-2.3.2-15-2016-00015 projektek társfinanszírozásával valósult meg.