

**Új diagnosztikai és terápiás lehetőségek
mitokondriális funkciózavarral járó kórképekben**

Tuboly Eszter

Ph. D. Tézis

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



**Témavezető:
Prof. Dr. Boros Mihály**

Szegedi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Sebészeti Műtéttani Intézet

2014

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények listája

- I.** Tőkés T, **Tuboly E**, Varga G, Major L, Ghyczy M, Kaszaki J, Boros M. Protective effects of L-alpha-glycerolphosphorylcholine on ischaemia-reperfusion-induced inflammatory reactions. *Eur J Nutr.* 2014 (E-pub ahead of print) **IF: 3.127**
- II.** Tőkés T, Varga G, Garab D, Nagy Z, Fekete G, **Tuboly E**, Plangár I, Mán I, Szabó RE, Szabó ZI, Volford G, Ghyczy M, Kaszaki J, Boros M, Hideghéty K: Peripheral inflammatory activation after hippocampus irradiation in the rat. *Int J Radiat Biol.* 2014; 90:1-6 **IF: 1.895**
- III.** **Tuboly E**, Szabó A, Erős G, Mohácsi A, Szabó G, Tengölics R, Rákhely G, Boros M. Determination of endogenous methane formation by photoacoustic spectroscopy. *J Breath Res.* 2013; 7(4):046004. **IF: 3.590**
- IV.** **Tuboly E**, Szabó A, Garab D, Bartha G, Janovszky Á, Erős G, Szabó A, Mohácsi Á, Szabó G, Kaszaki J, Ghyczy M, Boros M. Methane biogenesis during sodium azide-induced chemical hypoxia in rats. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2013; 304(2):C207-214. **IF: 3.715**
- V.** Boros M, **Tuboly E**, Mészáros A, Amann A: The role of methane in mammalian physiology - is it a gasotransmitter? *J Breath Res.* **(bírálat alatt)**

A tézis témájához tartozó egyéb közlemények listája

- I.** Varga G, Érces D, **Tuboly E**, Kaszaki J, Ghyczy M, Boros M. Characterization of the antiinflammatory properties of methane inhalation during ischaemia-reperfusion. *Magy Seb.* 2012; 65(4):205-11. **IF: 0**
- II.** Szabó A, Ruzsanyi V, Unterkofler K, Mohácsi Á, **Tuboly E**, Boros M, Szabó G, Hinterhuber H, Amann A: Exhaled methane concentration profiles during exercise on an ergometer. *J Breath Res.* **(bírálat alatt)**

BEVEZETÉS

A mitokondriális oxido-reduktív stressz

Csaknem minden eukarióta sejtípus tartalmaz mitokondriumokat, evolúciósan konzervált, kettős membránnal határolt sejtstruktúrákat. A külső membrán az iontranszport fő színtere, a belső membránba ágyazva találhatók a légzési láncot felépítő proteinek, míg a mitokondrium mátrixban a Krebs-Szent-Györgyi (citromsav) ciklus zajlik. A mitokondriális genom mindössze 37 kódoló gént tartalmaz, amelyek 16 fehérje kifejeződéséért felelősek, s ezek mindegyike az elektrontranszportlánc (ETC) működését irányítja.

Az ETC fehérje komplexei 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. Ez az energia végül meghajtja az ATP-szintetáz enzimet, amely a légzési láncnak ugyan nem része, de a folyamat végső célja, hiszen itt képződik ATP formájában az életműködéshez szükséges energia.

Az ETC optimális működése létfontosságú, de ismert tény, hogy az elektronátadás nem tökéletes: az oxigén molekulák 1-2%-ából reaktív oxigén gyökök (ROS), szuperoxid anionok (SOX) képződnek a tökéletlen redukció következtében (Nohl, 1978). A mitokondriumban több redox centrum található, ahol ROS képződés lehetséges, ezek főképp az I. és III. komplexek (Dröse, 2012). Az I. komplex ROS termelődése erőteljesen fokozódik szukcinát, azaz a II. komplex specifikus szubsztrátja (Bleier, 2012, Ishii, 2013) alkalmazásával, s ez a jelenség az I. és II. komplexek közötti reverz elektronáramlással magyarázható. A ROS képződés károsíthatja a mitokondrium működését, többek között lipid peroxidációhoz vezethet, melynek során a kettős membránban található többszörösen telítetlen zsírsavak gyorsan és fokozottan oxidálódnak (Bindoli, 1988).

A redox egyensúly *in vivo* felborulása „reduktív” vagy „oxidatív” stresszhez vezet. Reduktív stressz akkor következik be, amikor elektron akceptor molekula, például oxigén nincs elegendő mennyiségben jelen, vagy az ETC-ban fellépő hiba miatt nem kerül felhasználásra, s az így kialakuló reduktív túlsúly az ATP koncentráció csökkenéséhez, majd progresszív strukturális és funkcionális változásokhoz vezet. Az ETC helyreállítása, vagyis az oxigénellátás újraindulása sem jelent tökéletes megoldást, ekkor „oxidatív stressz” generálódhat, amely ROS felszabadulással és számos káros következménnyel, többek között lipid peroxidációval és a fehérjék, a DNS és más molekulák oxidációjával jár. A két folyamat egymás nélkül nem létezik. Az oxido-reduktív stressz klinikai megfelelője az

iszkémia/reperfúzió (I/R), ahol a vértelenség alatt az oxigénhiány miatt generálódó redukív ágensek és az akceptort nélkülöző elektronok akkumulációja miatt - majd a véráramlás újraindulásakor rendelkezésre álló oxigénmolekulák és a feldúsult elektronok miatt - nagy mennyiségű ROS képződik. Számos további kórkép ismert, amelyekben kritikus pont az ETC gátolt működése, az oxigénhiány, vagy az oxigén-felhasználási képesség romlása nyomán fellépő oxido-reduktív stressz. Ilyen például a 2. típusú diabetes mellitus, különféle szív-és érrendszeri és neurodegeneratív megbetegedések (Boland, 2013; Dikalov 2013; Mukherjee, 2013; Ngo, 2013; Huang, 2014). Ezekben az esetekben a lipid-peroxidáció, az ETC károsodása, a létfontosságú membrán pórusok, ioncsatornák integritásának megszűnése döntő fontosságú.

Biológiai gázok és a metán

A nitrogén monoxid, a szénmonoxid, vagy a kénhidrogén élettani-kórtani szerepe rendkívül fontos. Ezeket a gázokat a korábbiakban biológiailag inertnek tartották, de ma már jól ismert, hogy szabályozott enzimatis útvonalonon képződve, saját molekuláris célpontjaik vannak (Rochette, 2013; Szabó, 2013; Gadhia, 2014). Bizonyos szempontok alapján ezek sorába illeszkedhet a metán is. A metán biológiai szerepe még nem kellően tisztázott, de a bioaktivitásra egyre több adat utal. *In vivo* és *in vitro* kísérletes körülmények között befolyásolja a gasztrointesztinális (GI) rendszer motilitását (Attaluri, 2010). A metán bélperisztaltikát módosító hatását igazolták irritábilis bél szindrómában és krónikus konstipációban humán betegeken is (Soares, 2005; Sahakian, 2010). Saját, korábbi állatkísérletes vizsgálatainkban azt is kimutattuk, hogy exogén, normoxiás 2.5% metán gázkeverék alkalmazása csökkenti a GI gyulladás jeleit (Boros 2012).

Az abiotikus metántermelődés

A metán a legredukáltabb szénvegyület, apoláros, színtelen, szagtalan gáz. Légköri koncentrációja mintegy 2.5-szeresére nőtt az ipari forradalom óta, ezért az egyik legfontosabb üvegház-hatású gáznak tekintik (Denman, 2007; Mitchell, 2013). Jelen ismereteink szerint a tengerekben zajló abiotikus folyamatok mellett ez elsősorban a fosszilis energiahordozók feldolgozásának köszönhető.

A bakteriális metántermelődés

A biotikus metánképződés az emlősök vastagbelében is megtalálható metanogén *Archaea* ősbaktériumok működéséhez köthető, amelyek hosszú szénláncú alkánokból képeznek metánt, specifikus enzimrendszereik segítségével (Zengler, 1999). Ezek obligát anaerob mikroorganizmusok, környezetük redox potenciáljának -300 mV-nál alacsonyabbnak kell lennie az életben maradásukhoz (Morris, 2012).

A humán GI rendszerben - máig tisztázatlan okokból - megtelepedő metanogén baktériumok szerepe, jelentőségük, élettani és kórtani funkciójuk nem ismert. Ugyanakkor csak a populáció kisebb hányada, 20-30%-a számít metántermelőnek, az elfogadott definíció szerint ez legalább 1 ppm (parts per million) koncentrációban kilégzett metánt jelent egy lélegzetvételt követően (Costello, 2006). A metántermelés aránya azonban rendkívül változatos, etnikai csoporttól függően akár 24-58% lehet (Pitt, 1980), de fekete afrikai lakosság esetén 80%-ot is észleltek (Costello, 2013). E jelenség oka nem világos, de valószínűnek tűnik, hogy a földrajzi helyzettel összefüggő életmód is kapcsolatba hozható a metántermelő státusz kialakulásával.

A baktériumoktól független biogén metántermelődé

Az általánosan elfogadott elmélettel ellentétben biogén metán nem kizárólag a metanogén mikroorganizmusok metabolizmusa során képződik. Több adat bizonyítja, hogy eukarióta sejtekben baktériumok jelenléte nélkül is bekövetkezhet metán felszabadulás. Metánképződés igazolható mitokondriumokkal végzett *in vitro* kísérletekben (Boros 2002), növényekben (Keppler, 2006, Messenger, 2008, McLeod, 2009) és gombákban is (Lenhart, 2009). Kimutatták azt is, hogy a metán képződés hátterében a mitokondriális funkciók közvetlen gátlása, illetve az oxigénhiány következtében fellépő ROS termelődés állhat (Ghyczy, 2001, 2003, 2008; Keppler, 2006; Messenger, 2009).

A metánkoncentráció mérése fotoakusztikus spektroszkópiával

Az *in vivo* - bakteriális vagy nem-bakteriális - metánképződés vizsgálatát, a mechanizmus feltárását nehezítik az alkalmazható mérőmódszerek korlátai. A humán, vagy kísérletes mérések esetében a metán szintek pontos, időbeli változásait követő diagnosztikus eszközre lenne szükség, de a hagyományosan alkalmazott gázkromatográfia költséges, használata szaktudást igényel, nem alkalmas folyamatos mintavételre és nem használható kicsiny, rövid időintervallumon belül lezajló változások kimutatására sem. Jelenleg a humán metánképződés kimutatása a kilélegzett levegő metántartalmának gázkromatográfiával történő meghatározásával fontos klinikai, diagnosztikai eljárás, anyagcsere- és bélműködési zavarok esetén (Le Marchand, 1992; Lacy Costello, 2013). Meg kell itt jegyezni, hogy a tüdőkön keresztül történő gáz kilépés nem kizárólagos útja a metán távozásának: jól mérhető felszabadulás detektálható a humán bőrfelszínen keresztül is (Nose, 2005).

A fenti célokra a gázkromatográfia hiányosságait kiküszöbölő, hatékonyabb megoldásnak tűnik a fotoakusztikus spektroszkópia elvén alapuló gázanalízis, amely élettani kísérletekben már bevált különböző, heteroatomos gázok meghatározására (Cristescu, 2008). E módszer előnye lehet, hogy folyamatos mintavételt biztosítható, nagy specificitással

rendelkezik a kívánt gázra nézve és a használata a gázkromatográfiánál jóval költséghatékonyabb. Kísérletes körülmények között nem csak a lélegzet, hanem akár bőrfelületi, vagy teljes-test analízisre is alkalmassá tehető.

Az L-alfa glicerilfoszforilkolin

A korábbi kísérletes vizsgálatok során kiemelten foglalkoztunk a membránalkotó foszfatidilkolin (PC) és az endogén PC metabolitok terápiás, gyulladáscsökkentő hatásával. Kimutattuk azt is, hogy a bioaktivitás a metil-donor komponenseket tartalmazó poláros fejjel hozható kapcsolatba. Az L-alfa glicerilfoszforilkolin (GPC) a PC deacilált származéka, az acetilkolin szintézis során a szervezetben is képződő intermedier, a PC prekursoraként a vérkeringésben szabadon is megtalálható. Hatékonyságát klinikai vizsgálatokban is bizonyították, neurodegeneratív megbetegedésekben GPC alkalmazásával csökkenthető a demencia, valamint a kognitív funkciók romlása (Sangiorgi, 1994; Jesus Moreno, 2003). Intézetünk korábbi kísérletei során GPC kezeléssel csökkenthető volt a hippocampus besugárzás által kiváltott pro-inflammációs citokin felszabadulás (Tőkés, 2014) és a parciális máj I/R alatti ROS képződés is (Hartmann, 2014).

CÉLKITŰZÉSEK

1. Első célunk az volt, hogy az SZTE-TTIK Optikai és Kvantumelektronikai Tanszék munkatársaival együttműködésben kidolgozzunk egy mérőrendszert a metán koncentráció specifikus, valós idejű mérésére, amellyel az *in vivo* metánképzés dinamikája pontosan nyomon követhető. A fotoakusztikus spektroszkópia elvén alapuló eszköz validálásának részeként méréseket terveztünk laboratóriumi rágeszélők (egér, patkány) testfelszínén át történő metán kibocsátásának meghatározására, az e célnak megfelelő vizsgálati rendszer kialakításával.
2. Célkitűzésünk szerint megvizsgáltuk a mérőeszköz humán, orvosi alkalmazási lehetőségeit is, a kilélegzett levegő metán analízisével, egészséges emberek heterogén csoportjában.
3. Feltételeztük a mitokondriális elektrontranszportban bekövetkező funkciózavarok szerepét a nem-bakteriális metánképződésben. Célkitűzésünk szerint egymáshoz kapcsolható kisállat modellekben, standardizált oxido-reduktív stressz állapotokban kívántuk igazolni és nyomon követni a nem-bakteriális biogén metántermelődést *in vivo* körülmények között, az általunk kifejlesztett fotoakusztikus spektroszkópos módszer segítségével.
4. Célul tűztük ki a deacilált PC származék GPC metántermelődésre gyakorolt hatásának vizsgálatát, továbbá vizsgálni kívántuk a GPC hatásait az antigén-független gyulladáson

aktivációra, valamint esetleges protektív szerepét a mitokondriális oxido-reduktív stressz következményeire nézve.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Fotoakusztikus spektroszkópia

A diódalézeres fotoakusztikus spektroszkópos metodika meghatározott hullámhosszon történő fényelnyelést követő hőtágulás segítségével mér, nagy pontossággal, igen kis koncentrációban (Rocha, 2012; Jahjah, 2014). A metán elnyelési maximuma 1650.9 nm, a lézertényt specifikusan erre a hullámhosszra moduláltuk, ezért egyéb gázok, vagy a vízgőz együttes detekciója kizárható volt. A mintavétel során egy pumpa segítségével, meghatározott sebességgel, folyamatos levegőárammal kerül be a minta a fotoakusztikus kamrába, ahol a lézertény áthalad rajta. A fényabszorpciót követően a metánmolekula közvetlen környezete hőtágulást szenved, amely jelenség hanghullámokat generál, s végül ezeket a hullámokat az akusztikus rezonátor érzékeli, 5.2 kHz frekvenciával. A műszerhez fejlesztett szoftver segítségével a jelek számítógépesen is analizálhatóak és tárolhatóak.

Kísérletek rágcsálókkal

Állatkísérleteink során hím Sprague-Dawley patkányokat (220-300 g) és SKH-1 kopasz egereket (32-36 g) használtunk, az SZTE Munkahelyi Állatkísérletes Bizottságának engedélyével.

Teljes-test metánmérés

Vizsgálati rendszerünket, amellyel az éber állatok metán kibocsátását folyamatosan nyomon tudtuk követni, előzetes kísérletek után alakítottuk ki. A rágcsálók testméretétől függően két, hermetikusan zárható üveg mérőkamrát készítettünk. Az állatok 8, illetve 10 percet töltöttek a kamrában, nyugalmi állapotban, így az adott térfogatban a meghatározott időtartam alatt normoxiás állapotban maradtak. A környezeti levegő metántartalmát minden kísérleti mérés előtt meghatároztuk, majd a kamra levegőmintáját folyamatos levegőárammal a fotoakusztikus mérőcellába juttattuk a diódalézeres analízis céljából. A környezeti levegőhöz viszonyított eltérés alapján számoltuk az állatok teljes testfelszínre vonatkoztatott metán kibocsátását.

Mérések egészséges humán önkéntesekkel

A mintavétel az SZTE ÁOK Etikai Bizottság engedélyével zajlott, írásos beleegyező nyilatkozatok után. A kilélegzett levegő analízise minden esetben ugyanazon napszakban történt (a reggeli órákban), étkezés előtt. A résztvevőket nem (44 férfi és 39 nő), valamint kor alapján (42 fő 21 évesnél fiatalabb és 41 fő 21 évesnél idősebb alany) csoportokba osztottuk.

Nyugodt légzés mellett lélegzetmintát vettünk, melyet folyamatos levegőáram juttatott a mérőkészülék fotoakusztikus kamrájába. A résztvevőket 1 ppm metánkoncentráció fölötti értékek esetén metántermelőnek tartottuk.

Kísérletes mitokondriális funkciózavar indukálása

1. Krónikus nátrium-azid (NaN_3) kezelés és a GPC hatásainak vizsgálata patkányokban

A NaN_3 az ETC IV. komplexének specifikus gátlószere (Bennett, 1996). A vizsgálatok során 35 patkányt véletlenszerűen 5 kísérleti csoportba osztottunk. Az első csoport ($n=7$) kezeletlen, álműtött volt, a második csoportban ($n=7$) NaN_3 kezelést alkalmaztunk ($14 \text{ mg kg}^{-1} \text{ nap}^{-1}$ nyolc napig, napi egyszeri sc injekcióval). A harmadik csoportban ($n=7$), a NaN_3 kezelést ($14 \text{ mg kg}^{-1} \text{ nap}^{-1}$ sc 8 napig) GPC kezeléssel egészítettük ki ($50 \text{ mg kg}^{-1} \text{ nap}^{-1}$ per os). A negyedik csoportban ($n=7$), az állatok antibiotikum előkezelés után (rifaximin per os, $10 \text{ mg kg}^{-1} \text{ nap}^{-1}$ 3 napig) NaN_3 kezelést kaptak ($14 \text{ mg kg}^{-1} \text{ nap}^{-1}$ sc 8 napig) és az antibiotikum kúrát ezalatt is folytattuk, az esetleges GI metanogén baktériumtörzsek eliminációja céljából. Az ötödik csoport ($n=7$) kontrollként szolgált, az állatoknak rifaximint adtunk per os ($10 \text{ mg kg}^{-1} \text{ nap}^{-1}$) 11 napig. Az éber állatokon teljes-test metánmérést végeztünk minden második napon, majd a vizsgálatok végén túlaltatást követően (5% kloráldihidrát 375 mg kg^{-1}) szövetmintákat vettünk, amelyeket $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ -on tartottunk a további mérésekig.

2. Endotoxaemia egerekben

Az endotoxin a Gram-negatív baktériumok külső membránjában található lipopoliszacharid (LPS); az LPS által kiváltott generalizált gyulladási reakcióban fontos szerepet játszik a mitokondriális ETC funkciózavara. Vizsgálatunkban az állatok véletlenszerűen kerültek 3 kísérleti csoportba. Az első csoport ($n=8$) kezeletlen kontrollként szolgált, a második csoportban ($n=8$) 10 mg kg^{-1} per os rifaximin alkalmazásával az esetleges metanogén bélflóra eliminációját végeztük el, a kezelést 2 nappal később megismételtük. További két nap elteltével került sor a metánképződés mérésére. A harmadik csoportban ($n=8$) endotoxaemiát hoztunk létre 5 mg kg^{-1} i.p. LPS alkalmazásával, majd 3 órával később CH_4 mérésre került sor.

3. Mesenterialis I/R patkányokban

Az I/R kórtanában döntő szerepet játszik az érintett sejtek mitokondrium membrán depolarizációja és az ETC diszfunkciója, mely az ATP képzés zavarához vezet (Raffaello, 2011). Harmadik protokollunkban 32 patkányt osztottunk véletlenszerűen 4 kísérleti csoportba. A műtéteket nátrium-pentobarbitál altatásban (50 mg kg^{-1} ip) végeztük. Az első csoport ($n=8$) kezeletlen, álműtött csoportként szolgált; a második csoportban ($n=8$) az arteria

mesenterica superior mikroklippel történő lezorításával mesenterialis iszkémiát hoztunk létre 45 percre amelyet a klip felengedésével 180 perc reperfüzió követett. A harmadik és negyedik csoportban (n=8-8) az I/R protokollt megismételtük GPC elő, illetve utókezeléssel kiegészítve (16.56 mg kg⁻¹ iv; pre: bólusban, közvetlenül a lezorítást megelőzően; post: az iszkémia utolsó percében, bólusban). A kísérletek során folyamatosan monitoroztuk a keringési paramétereket, majd a reperfüzió 180. percének elteltével szövetmintákat vettünk, melyeket -70 °C-on tartottunk a további mérésekig.

4. A hippocampus besugárzás következményei, gamma-irradiáció hatásai patkányban

Sugarhatásra több sejtalkotó, köztük a mitokondriumok és a mitokondriális membránok is sérülhetnek (Limoli, 2004; Pandey, 2004). A negyedik kísérletes sorozatban 18 patkányt osztottunk véletlenszerűen 3 kísérleti csoportba. A beavatkozásokat minden esetben 5% klorálhidrát altatásban (375 mg kg⁻¹ ip) végeztük. Az első és második (n=6-6) csoportban az állatok 0.5 ml steril fiziológiás sóoldatot kaptak intravénásan. A második és harmadik csoportban az altatást követően kobalt készülékkel 40 Gy gamma-besugárzás történt (1 Gy/2.25 perc) a hippocampus mindkét oldalán, illetve a harmadik csoportban (n=6) az állatok 50 mg/kg GPC iv. kezelést kaptak, 5 perccel a besugárzás előtt. A kísérletek végeztével szövetmintákat vettünk az állatoktól amelyeket -70 °C-on tartottunk a további mérésekig.

Biokémiai mérések

Máj ATP meghatározás

A mintákat 6%-os triklórecetsavval homogenizáltuk, majd 5000 g-vel 1 percig centrifugáltuk. 100 µl ATP assay mix-et adtunk (összetétel: firefly luciferase, luciferin, MgSO₄, EDTA, DTT és BSA Tricine pufferban oldva) 100 µl felülúszóhoz. A kapott jelet luminométerrel detektáltuk és ATP kalibrációs görbe felvételét követően számítottuk ki az értékeket.

Bél xantin oxidoreduktáz (XOR) enzimaktivitásának mérése

A mintákat homogenizáltuk (puffer összetétel: 50 mM Tris-HCl 0.1 mM EDTA, 0.5 mM dithiotreitol, 1 mM fenilmetilszulfonil-fluorid, 10 µg ml⁻¹ szójabab tripszin inhibitor, 10 µg ml⁻¹ leupeptin), majd 20 percig 24000 g-vel centrifugáltuk. A felülúszóból fotométer segítségével határoztuk meg az aktivitás értékeket.

Bél mieloperoxidáz (MPO) enzimaktivitásának meghatározása

A mintákat homogenizáltuk (puffer összetétel: 50 mM Tris-HCl 0.1 mM EDTA, 0.5 mM dithiotreitol, 1 mM fenilmetilszulfonil-fluorid, 10 µg ml⁻¹ szójabab tripszin inhibitor, 10 µg ml⁻¹ leupeptin), 20 percig 24000 g-vel centrifugáltuk, majd 100 µl felülúszót 37 °C-on 5 percig inkubáltunk az enzimreakció mix-el (összetétel: 50 mM K₃PO₄ puffer, 2 mM 3,3', 5,5'

tetramethylbenzidine DMSO-ban oldva). A képződött kék színreakciót spektrofotométerrel detektáltuk, 450 nm-en.

Bél szuperoxid (SOX) koncentrációjának meghatározása

Körülbelül 25 mg-os szövetmintákat 1 ml Dulbecco oldatba helyeztünk, majd 5 μ M lucigenint adtunk minden mintához. 2 perc sötétadaptációt követően a kapott jelet luminométerrel detektáltuk, 20 μ l nitroblue tetrazolium (NBT) jelenlétében és anélkül. Az NBT SOX inhibitor, így a csillapítás mértékéből következtethetünk a SOX képződés intenzitására (Ferdinandy, 2000).

Intravitális videomikroszkópia (IVM)

Ezzel a módszerrel az *in vivo* megfestett sejtés véralkotók, vagy a plazma jelölésével a sejtés reakciók, a microvascularis érátmérő, az áramlási sebesség és az érfal permeabilitási viszonyai is tökéletesen vizualizálhatók. A képek Zeiss AxioTech Vario 100HD mikroszkóp segítségével készültek, a kiértékelés off-line, a képkockák számítógépes analízisével történt.

A patkányokat nátrium-pentobarbitállal (60 mg kg^{-1} ip.) altattuk, majd a jugularis vénákat kanüláltuk. Az állatok fluorescein izotiocianáttal (FITC, 0.2 ml, iv) jelölt vért kaptak a vörösvértestek láthatóvá tételéhez, a polimorfonukleáris leukocytákat rhodamine-6G-vel jelöltük (0.2 ml, iv). Vizsgáltuk a vörösvértestek áramlási sebességét, állatonként 5 máj sinusoidban 5-5 különböző látómezőben, ezen kívül megszámláltuk a kitapadt, gördülésben már nem lévő leukocytákat, állatonként 5 centrális máj venulában.

In vivo szövetten

Valós idejű laser pásztázó konfokális endomikroszkóppal (Optiscan, Notting Hill, Australia) vizsgáltuk a májszövetek állapotát. A konfokális mikroszkóp fluoreszcensen jelölt minták vizsgálatára alkalmas, segítségével *in vivo* vizsgálhatók a megfestett képletek 7 μ m-es optikai szeletei, a kapott digitális kép számítógéppel analizálható. Az excitációs hullámhossz 488 nm, az emisszió 505-585 nm tartományban történik. A patkányokat nátrium-pentobarbitállal (60 mg kg^{-1} ip) altattuk, majd a szöveti struktúrát akridin orange festék helyi alkalmazásával tettük láthatóvá. Vizsgáltuk a máj sinusoidok vastagságát, illetve a hepatocyták épségét, alakját. Minden állat esetében 30-50 felvételt készítettünk, amelyeket később egy szemikvantitatív pontrendszer alapján értékeltünk ki. Az analízis során értékeltük a máj sinusoidok és a hepatocyták strukturális és morfológiai változásait, valamint az ödéma esetleges jelenlétét.

Statisztikai analízis

Statisztikai analízisünket a Sigma Stat for Windows programcsomaggal végeztük. Az adatsorokat elemezve nem találtunk normális eloszlást, ezért nem-paraméteres, Friedman

ismételt méréses tesztekét végeztünk a csoportokon belüli különbségek meghatározására. Időfüggő vizsgálatok esetében Kruskal-Wallis tesztet, majd Dunn-féle post hoc tesztet használtunk a különbségek megállapítására, csoportok között. A humán vizsgálatokban nem paraméteres Mann-Whitney-féle U próbát alkalmaztunk a csoportok közötti különbségek megállapítására.

EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉSÜK

Teljes-test metán analízis

Elsőként egészséges rágcsálók teljes-test metánkibocsátását vizsgáltuk, ahol nem észleltünk a környezeti levegőnél magasabb értékeket, vagy napi ingadozást. A gázkromatográfus összehasonlító mérések alapján kijelenthettük, hogy mérőmódszerünk nem-invazív módon alkalmasnak bizonyult metán analízisre, éber állapotban, folyamatos mintavétellel, jó reprodukálhatósággal, kis koncentrációtartományok esetében is.

A NaN_3 az elektrontranszportlánc IV. komplexének specifikus gátlószere, ezért krónikus kezeléssel direkt mitokondriális funkciózavart, kémiai hipoxiát lehet kiváltani (Bennett, 1996). A NaN_3 csoportban jelentős metán-felszabadulást észleltünk a kísérlet végére (M: 2.974 dppm/1000 dm²; p25: 2.630 dppm/1000 dm²; p75: 3.362 dppm/1000 dm²) a kontroll csoportokhoz képest (álműtött: M: 1.337 dppm/1000 dm²; p25: 1.078 dppm/1000 dm²; p75: 1.598 dppm/1000 dm²; antibiotikumos kontroll: M: 1.598 dppm/1000 dm²; p25: 0.938 dppm/1000 dm²; p75: 1.673 dppm/1000 dm²). A GPC-vel kezelt NaN_3 -os csoportban a metán emelkedés elmaradt (M: 1.11 dppm/1000 dm²; p25: 0.83 dppm/1000 dm²; p75: 1.437 dppm/1000 dm²), a metán koncentráció a vizsgálat teljes időtartama alatt a kontroll szintjén maradt. Az antibiotikummal kiegészített NaN_3 kezelt csoportban az első mérési napokon nem volt metánkoncentráció emelkedés (M: 1.135 dppm/1000 dm²; p25: 0.848 dppm/1000 dm²; p75: 1.312 dppm/1000 dm²), ám a vizsgálat végére metán generációt észleltünk ebben a csoportban is.

Az endotoxémiás egerek esetében szignifikáns metánkoncentrációkat mértünk (M: 4.53 dppm/cm² 10³; p25: 4.37 dppm/cm² 10³; p75: 5.38 dppm/cm² 10³) a kontroll csoporthoz képest (M: 3.25 dppm/cm² 10³; p25: 3.00 dppm/cm² 10³; p75: 3.89 dppm/cm² 10³), míg az antibiotikum kezelés itt csökkentette a metán képződést (M: 1.71 dppm/cm² 10³; p25: 1.50 dppm/cm² 10³; p75: 2.11 dppm/cm² 10³).

Az eddigieket összefoglalva: az általunk alkalmazott CH₄ mérési módszer két különböző rágcsáló vizsgálatosorozatban is hatékony és megbízható eljárásnak bizonyult, amely jól helyettesítette a gázkromatográfot. A gázképződés dinamikát meg lehetett

határozni, az adszorpció-deszorpcióból eredő esetleges mérési hibák valószínűsége minimálisnak bizonyult, mintavesztés lehetőségét kizártuk. Megállapítható, hogy a rendszer már egészen kis koncentrációtartományok esetén is megbízhatóan működik, alacsony ráfordítási költségekkel.

A mitokondriális diszfunkciót követően kapott eredményeink alátámasztották hipotézisünket, miszerint rövid válaszidőt követően nagymértékű metán-felszabadulás jelentkezik. A jelenség függetlennek bizonyult a metanogén flóra metabolizmusától és intenzitása GPC kezelés hatására lényegesen csökkent. Ismeretes, hogy oxido-reduktív stressz hatására a ROS képződés mellett kritikus a mitokondrium NADH/NAD^+ egyensúlyának eltolódása, ezáltal jelentősen reduktív környezet alakul ki. A rendszer kizárólag elektronakceptorok jelenlétében állhat helyre, amelyek elektrofil metilcsoporttal (EMG) rendelkező molekulák lehetnek. Valószínűsíthető, hogy a szervezet hosszú szénláncú molekulák redukciójával próbálja előállítani azokat a kémiai funkciós csoportokat, amelyekkel regenerálni képes a lipid-peroxidáció során károsodott membránokat. E potenciálisan protektív folyamat végterméke lehet a tovább már nem redukálható metán. Feltételezhető, hogy EMG-ban gazdag molekulák alkalmazásával (mint amilyen a GPC) a stressz állapotban levő szervezetnek nincs arra szüksége, hogy redukció útján a saját anyagaiból pótolja a nélkülözhetetlen csoportokat, így a metántermelődés elmarad. Ennek tükrében a metánra, mint indikátor molekulára, azaz az oxido-reduktív stresszállapotok korai biomarkerére gondolhatunk.

Humán önkéntesek lélegzetanalízise

A különböző életkorú és életmódot folytató önkéntesek kilégzett metánkoncentrációi 0-36.9 ppm között mozogtak, amely megfelel a vonatkozó irodalmi adatoknak (Costello, 2013). A populáció egészét tekintve 21% volt a metántermelők aránya, amely megfelel a közép-európai országokban mért átlagnak. Nemek közötti különbséget nem találtunk a kilégzett metán mennyiségében ($p = 0.831$), azonban megállapítottuk, hogy a felnőttek jóval több metánt termelnek, mint a fiatalabb korosztályok ($p = 0.079$). Mindebből a kontroll mérések fontosságára következtethetünk, valamint arra, hogy meghatározott korcsoportokra kell vonatkoztatni a metán termelők/nem termelők arányát.

GPC kezelés hatása az oxido-reduktív és gyulladássos folyamatokra

Az első kísérletes modellünkben a krónikus NaN_3 kezelés jelentősen csökkentette az ATP mennyiségét (M: $0.122 \text{ nmol ml}^{-1} \text{ mg}^{-1}$; p25: $0.089 \text{ nmol ml}^{-1} \text{ mg}^{-1}$; p75: $0.189 \text{ nmol ml}^{-1} \text{ mg}^{-1}$), a GPC kezelés esetén a kontroll értékek közelében maradtak (M: $0.199 \text{ nmol ml}^{-1} \text{ mg}^{-1}$; p25: $0.182 \text{ nmol ml}^{-1} \text{ mg}^{-1}$; p75: $0.222 \text{ nmol ml}^{-1} \text{ mg}^{-1}$). Hasonló eredményeket

tapasztaltunk I/R után és a gamma sugárzás hatásait vizsgáló modellünkben is, ahol a stresszhatás következtében szignifikánsan csökkenő ATP szintek (IR: M: 1206.74 nmol g⁻¹; p25: 1093.51 nmol g⁻¹; p75: 1521.03 nmol g⁻¹; gamma-besugárzás: M: 71.9 nM; p25: 57.7 nM; p75: 100.9 nM vs M: 120.4 nM; p25: 117.5 nM; p75: 126.6 nM) mellett a GPC kezelés minden esetben megőrizte vagy növelte az ATP tartalmat (IR + GPC: M: 1977.41 74 nmol g⁻¹; p25: 1802.51 74 nmol g⁻¹; p75: 2133.95 74 nmol g⁻¹; gamma-besugárzás + GPC: M: 119.4 nM; p25: 113.1 nM; p75: 123.2 nM). A GPC kezelés minden dózisban és formában fenntartotta az ATP szintet, így következtetésünk szerint protektív hatású lehet mitokondriális funkciózavar esetén.

Hasonlóképpen, az oxido-reduktív stressz mértékére utaló biokémiai paraméterek és intravitális mikroszkópos eltérések esetében is potenciálisan kedvező változásokat tapasztaltunk. A szöveti oxigénhiány biológiai, valamint kémiai modelljében is jelentősen fokozódott a vékonybél XOR enzimaktivitás (NaN₃: M: 316.2 pmol min⁻¹ mg⁻¹; p25: 240.9 pmol min⁻¹ mg⁻¹; p75: 535.4 pmol min⁻¹ mg⁻¹; IR: M: 78.6 pmol min⁻¹ mg⁻¹; p25: 67.7 pmol min⁻¹ mg⁻¹; p75: 80.2 pmol min⁻¹ mg⁻¹), nőtt a szöveti SOX koncentráció (IR: M: 2019.4 cpm (g szövet)⁻¹; p25: 1814.5 cpm (g szövet)⁻¹; p75: 2349.3 cpm (g szövet)⁻¹) és szignifikáns csökkenést tapasztaltunk a GPC-vel kezelt állatokban mind a XOR aktivitás (NaN₃: M: 153.9 pmol min⁻¹ mg⁻¹; p25: 121 pmol min⁻¹ mg⁻¹; p75: 198.5 pmol min⁻¹ mg⁻¹; IR: M: 19 pmol min⁻¹ mg⁻¹; p25: 14 pmol min⁻¹ mg⁻¹; p75: 21 pmol min⁻¹ mg⁻¹), mind a SOX koncentráció vonatkozásában (GPC + IR: M: 1228 cpm (g szövet)⁻¹; p25: 839 cpm (g szövet)⁻¹; p75: 1568 cpm (g szövet)⁻¹). A ROS képződés gátlása mellett a GPC kezelés a gyulladásoz szövődményekre is jótékony hatásúnak bizonyult. Javította a NaN₃ alkalmazás következtében romló mikrokeringést a májban (NaN₃: M: 314.5 μm s⁻¹; p25: 290 μm s⁻¹; p75: 348 μm s⁻¹ versus NaN₃ + GPC: M: 444 μm s⁻¹; p25: 408 μm s⁻¹; p75: 616.5 μm s⁻¹), az aktivált leukocyták jelenlétére utaló MPO enzimaktivitást is jelentősen csökkentette a vékonybélben (NaN₃: M: 1271.5 pmol min⁻¹ mg⁻¹; p25: 1154.4 pmol min⁻¹ mg⁻¹; p75: 1366.5 pmol min⁻¹ mg⁻¹; versus NaN₃ + GPC: M: 914.5 pmol min⁻¹ mg⁻¹; p25: 783.3 pmol min⁻¹ mg⁻¹; p75: 944.9 pmol min⁻¹ mg⁻¹). A leukocytá-endothel interakciók megfigyelése során erőteljes leukocytá aktivációs tendenciát észleltünk a NaN₃-dal kezelt csoportban, amelyet mérsékelte a GPC kezelés. Ugyanezen vizsgálatban a szemikvantitatív skála alapján statisztikailag szignifikáns mértékű májszöveti károsodást nem tudtunk kimutatni, de a GPC kezelés mellett lényegében ép szöveti struktúrát találtunk.

A hippocampus CA1-es régiója különösen érzékeny a ROS képződés következményeire. A 40 Gy-vel történő hippocampus besugárzás szisztémás

következményekhez is vezetett, ATP depléciót okozott a májban, melyet a GPC kezelés hatékonyan kivédett. A besugárzástól távoli szervekre gyakorolt jótékony hatás tehát tovább erősítette a GPC mitokondriális védőhatására vonatkozó megfigyelésünket. Fontos megjegyezni, hogy a GPC és metabolitjai a májban mutathatók ki a legnagyobb mennyiségben (Abbiati, 1993).

Összefoglalásul tehát elmondhatjuk, hogy a GPC több támadásponttal bíró, protektív molekulának, vízdékony EMG-nek (metilcsoport-donor) tekinthető, amely könnyen átjuthat a membránokon. Élettani körülmények között a Kennedy szignál-transzdukciós útvonalon keresztül stimulálhatja PC szintézisét és membránokba történő beépülését (Gibbellini, 2010). Exogén PC már több I/R modellben bizonyult gyulladáscsökkentőnek, mérsékelte a ROS és a pro-inflammációs citokinek képződését is (Ghyczy, 2008; Varga, 2009; Kovács, 2012). Kísérleteink során GPC alkalmazásával az oxido-reduktív stressz gyulladási következményei csökkentek és a metán felszabadulás elmaradt és ez arra utalhat, hogy a GPC mint a PC természetes, a szervezetben is megtalálható prekürzora fontos szerepet játszhat az oxido-reduktív stressz során sérülést szenvedett membránok regenerációjában is (Bauernschmitt, 1993; Lee, 1993; Amenta, 1994). A pontos hatásmechanizmus tisztázása céljából azonban további *in vitro* kísérletek szükségesek.

A TÉZIS ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSAINAK ÖSSZEFOGLALÁSA

- 1.** A fotoakusztikus spektroszkópai elvén alapuló új gázanalitikai módszerünk alkalmasnak bizonyult a metán koncentráció folyamatos *in vivo* detekciójára kísérletes körülmények között. Meghatároztuk egy heterogén humán populáció kilégzett metánkoncentrációját is, ahol a kor szerint eltérő megoszlásban találtunk metán-termelő és nem termelő egyéneket.
- 2.** Elsőként határoztuk meg a teljes-test metán kibocsátást egészséges rágcshalókban, valamint különböző, standardizált módszerekkel előidézett mitokondriális funkciózavarokban, *in vivo* körülmények között.
- 3.** Kimutattuk, hogy kísérletes mitokondriális diszfunkció hatására jelentősen megnövekedik a felszabaduló metán koncentrációja, amely jelenség függetlennek bizonyult a metanogén flóra esetleges jelenlététől. Következtetésünk szerint a nem-bakteriális, biogén metán az oxido-reduktív stressz állapotok biomarkere lehet.
- 4.** A deacilált, metilcsoportokat tartalmazó PC metabolit GPC exogén alkalmazása mellett elmaradt a mitokondriális funkciózavart követő metántermelődés. A GPC kezelés hatékonyan csökkentette az oxido-reduktív stressz által okozott gyulladáshoz vezető következményeket, a máj ATP depléciót, valamint a pro-oxidáns folyamatokat is, így mindezek alapján hatékony és ígéretes gyulladáscsökkentő szernek tartható.

5. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsősorban szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Boros Mihály Professzor Úrnak, akit a világ legjobb mentorának tartok és aki nemcsak segíteni és motiválni, de mosolyra fakasztani is mindig jól tudott.

Ugyanígy köszönöm szépen Dr. Kaszaki Józsefnek, aki- akárcsak az Sebészeti Műtéttani Intézet számos munkatársa, bevezetett az igazi kutatómunka világába. Szeretném megköszönni az Intézet minden dolgozójának segítségüket és a vidám, munka közötti pillanatokot.

Hálával tartozom Szabó Annának és Dr. Mohácsi Árpádnak, akik nélkül kísérleti ötleteim csak a fantáziám szüleményei maradtak volna. Ők a legjobb kollaborációs partnerek!

Szeretnék köszönetet mondani mindazon klinikus és kutató kollégáimnak itthon és külföldön egyaránt, akiktől rengeteget tanultam, fejlődtem az évek során és ha nem is tartalmazza a közös munkánkat ez a tézis, nélkülük biztosan nem jutottam volna el a nagy pillanatig.

Szeretném ez úton is megköszönni a sok vidám pillanatot és támogatást barátaimnak, Haluszka Dórának, Kisvári Gábornak, Horváth Ádámnak, Nagy Viktóriának és Tax Gábornak, akikkel nemcsak az egyetemi padokat, de a lakásunkat, az életünket is megosztottuk.

Ugyanígy hálával tartozom Sántha Petrának, Fodor Eszternek, Zerinváry Szilárdnak és Garab Dénesnek, akikre szintén a kezdetektől fogva mindig számíthatok.

Külön köszönet illeti barátnőmet és egyben a világ legjobb munkatársát, Tőkés Tündét, aki nélkül biztosan nem tudtam volna végigcsinálni ezeket az éveket. Bartha Gábor pedig első diákkörösömként és jó barátomként rengeteget tett azért, hogy töretlen lelkesedéssel csináljam végig ezt a munkát.

Végül, de nem utolsósorban, szeretnék köszönetet mondani Családomnak, amiért mindig támogattak és hittek bennem és különösen társamnak, Dr. Lehoczki-Krsjak Szabolcsnak és ikertestvéremnek, Tuboly Csabának.

TÁMOGATÁS

A kutatás a TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001 Nemzeti Kiválóság Program című kiemelt projekt keretében zajlott. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg. További támogatás: TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0035, OTKA-K10465

Társszerzői nyilatkozat

Nyilatkozatomban rögzítem, mint az alábbi közlemény társszerzője, hogy az

European Journal of Nutrition

folyóiratban megjelent publikációban szereplő máj ATP koncentrációjának meghatározása, valamint a vékonybél xanthin oxidoreduktáz enzimaktivitás és szöveti szabadgyök koncentrációjának meghatározása vizsgálatok

Tuboly Eszter érdemi munkája, amelyet nem használnak fel más Ph.D. értekezéshez.

Tőkés T1, Tuboly E, Varga G, Major L, Ghyczy M, Kaszaki J, Boros M.: Protective effects of L-alpha-glycerolphosphorylcholine on ischaemia-reperfusion-induced inflammatory reactions.

Eur J Nutr. 2014 Mar 28. [Epub ahead of print]

Tuboly Eszter

Szeged, 2014. november 5.

Társszerzői nyilatkozat

Nyilatkozatomban rögzítem, mint az alábbi közlemény társszerzője, hogy az

International Journal of Radiation Biology
folyóiratban megjelent publikációban szereplő máj ATP koncentrációjának meghatározása
vizsgálat

Tuboly Eszter érdemi munkája, amelyet nem használnak fel más Ph.D. értekezéshez.

Tőkés T, Varga G, Garab D, Nagy Z, Fekete G, Tuboly E, Plangár I, Mán I, Szabó RE, Szabó Z, Volford G, Ghyczy M, Kaszaki J, Boros M, Hideghéty K.: Peripheral inflammatory activation after hippocampus irradiation in the rat.
Int J Radiat Biol. 2014 Jan;90(1):1-6

Tuboly Eszter

Szeged, 2014. november 5.