

Doktori értekezés tézisei

AZ OXIDATÍV STRESSZ ÉS AZ ANTIOXIDÁNS VÉDELMI RENDSZER VIZSGÁLATA NEHÉZFÉM KEZELÉST KÖVETŐEN PONTYBAN ÉS STREPTOZOTOCIN-INDUKÁLTA DIABÉTESZES PATKÁNY MODELLBEN

Jancsó Zsanett

Témavezető:

Dr. Hermeszt Edit

egyetemi docens

Biológia Doktori Iskola

Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatikai Kar
Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék



Szeged

2015

BEVEZETÉS

A szabadgyök kutatás napjainkban a tudományos érdeklődés középpontjában áll. Széleskörű vizsgálata elengedhetetlenül fontos a különböző patológiás folyamatokban bekövetkező változások mechanizmusának és összefüggéseinek feltérképezésében. Munkánk során olyan modellrendszerekben vizsgáltuk a molekuláris védekező mechanizmusokat, mint a nehézfém expozíció halakban és a STZ-indukálta diabétesz patkányokban, melyekben bizonyítottan fokozódik a szabadgyök képződés és oxidatív stressz alakul ki.

A szabadgyökös reakciók fiziológias körülmények között számos jól szabályozott biokémiai folyamat részei. A szabadgyök képződés stressz hatására fokozódhat, ami befolyásolhatja a biológiai rendszerek működését. Fokozott termelődésük következtében gyakorlatilag minden általunk ismert celluláris adaptációs reakcióút vonal aktiválódhat, beleértve az antioxidáns védelmi rendszert is. A túlzott mértékű szabadgyök képződés és/vagy az antioxidáns kapacitás csökkenése felboríthatja a prooxidánsok és antioxidánsok közötti egyensúlyt. Ebben az esetben oxidatív stressz alakul ki, melynek során károsodhatnak a sejt fehérjéi, a nukleinsavak és lipidperoxidáció (LP) következtében a sejtek membránjai is. Súlyos esetben a sejt alapvető életfunkciói oly mértékben sérülhetnek, hogy apoptózis vagy nekrozis következnek be.

Az oxidatív hatások kivédésére az aerob szervezetekben az evolúció során antioxidáns védelmi rendszer alakult ki, mely stressz hatására aktiválódhat. Az aktiválódás során a védelem egyes elemei indukálódhatnak, úgymint az általunk is vizsgált szuperoxid anion ($\bullet\text{O}_2^-$) *scavenger* szuperoxid dizmutáz (SOD) és a hidrogén-peroxidot (H_2O_2) bontó kataláz (KAT). Jelentős antioxidáns molekula a glutation (GSH), mely nehézfém terhelés esetén fémionok kötésére képes, és oxidatív stressz esetén könnyebben oxidálódik, mint a sejt makromolekulái. Emellett szubsztrátja a glutation peroxidáznak, mely szervetlen és szerves peroxidokat bont. A metallothioneinek (MT) kis molekulatömegű, ciszteint nagy arányban tartalmazó fémkötő fehérjék, amelyeknek a nehézfém detoxifikáció mellett jelentős szerepe van a szabadgyökök semlegesítésében is. Az általános antioxidáns védelmi rendszer részét képezik a hemoxigenázok (HO) is. Citoprotektív hatásuk abban rejlik, hogy a hem oxidatív lebontása során antioxidáns bilirubin termelődik, míg a redox-aktív Fe-at a szintén antioxidáns tulajdonságú ferritin megköti. Habár a hem bioaktív bomlástermékeinek számos

fiziológias tulajdonságuk mellett citoprotektív hatást tulajdonítanak, olyan kutatási eredmények is napvilágot láttak, melyek szerint bizonyos esetekben e molekulák fokozott jelenléte már káros is lehet.

Kísérleteink során a nehézfém terhelés (kadmium, arzén) és a hiperglikémia hatását tanulmányoztuk, párhuzamosan vizsgálva a szabadgyökök képződését a H_2O_2 és a peroxinitrit ($ONOO^-$) koncentráció meghatározásával, az antioxidáns védelmi rendszer szerepét a fentebb említett paraméterek mérésével, valamint az oxidatív stressz következtében kialakuló károsodások mértékét a LP, az apoptózis és a nekrozis meghatározásával.

CÉLKITŰZÉS

A.Nehézfém terhelés hatása halakban

Korábbi évek kutatásai eredményeként csoportunk számos, a stresszválaszban szerepet játszó fehérjét kódoló gént azonosított és jellemzett már pontyban. Jelen kísérleteink során az antioxidáns védekezés egy további elemét, a pontyban még nem azonosított hemoxigenázokat kódoló gének expresszióját tanulmányoztuk.

Kérdéseink a következők voltak:

1. Kimutatható-e különbség a fémek felhalmozódásában a méregtelenítés kulcsfontosságú szerveiben, májban és vesében az alkalmazott koncentráció és az idő függvényében?
2. Találunk-e összefüggést a *ho* gének kópiaszáma és a ponty tertaploid kromoszóma készlete között?
3. Kimutatható-e összefüggés a fémek szöveti eloszlása és:
 - a. a *ho* gének expressziós változása,
 - b. a szabadgyök képződés mértéke,
 - c. az antioxidáns védelmi rendszer aktiválódása,
 - d. és a szöveti károsodás mértéke között?

B.STZ-indukálta diabétesz hatása patkány bélben

Korábbi kísérleteink eredményei szerint a különböző bélszakaszokban a diabétesz során megfigyelt patológias változások colon-ileum-duodenum tengely mentén gradiens-szerűen alakultak ki. Ennek alapján kiválasztottunk két egymástól távol eső bélszakaszt, a duodenumot és colont, amelyek anatómiai felépítésükben és funkciójukban egyaránt különböznek egymástól. Munkánk során e két szakaszban vizsgáljuk a hiperglikémia által kiváltott oxidatív károsodást STZ-nal indukált kezeletlen és inzulin-kezelt diabéteszes patkányokban.

A következő kérdésekre kerestük a választ:

1. Kimutatható-e bélszakasz-specifikus változás:
 - a. a szövetkárosodás típusában és mértékében,
 - b. a szabadgyök képződés szintjében,
 - c. az antioxidáns védelemi rendszer egyes elemeinek aktiválódásában,
2. Hogyan befolyásolja az inzulin-kezelés a sejtek prooxidáns-antioxidáns egyensúlyát?

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

1. Kísérleti állatok és kezelési körülmények

Pontyok nehézfém-kezelése

Krónikus diabéteszes patkánymodell előállítása

2. Molekuláris biológiai vizsgálati módszerek

RNS preparálás fagyasztott mintákból

Reverz transzkripció (RT)

Polimeráz láncreakció (PCR): RT-PCR, qRT-PCR

Primertervezés

Géldokumentáció, denzitometrázás

Filogenetikai analízis

3. Biokémiai mérési módszerek

Fehérjék kvantitatív meghatározása

A GSH koncentráció meghatározása

A GSSG koncentráció meghatározása

A LP mérése

A H₂O₂ koncentráció meghatározása

A ONOO⁻ koncentráció meghatározása

SOD aktivitás meghatározása

KAT aktivitás meghatározása

Nhézfém-tartalom meghatározása

4. Hisztológiai vizsgálati módszerek

Elektronmikroszkópos vizsgálat: Nekrózis kimutatása

Posztembedding immunhisztokémiai vizsgálatok: HO-2, Kaszpáz-9

EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA ÉS MEGBESZÉLÉSE

A. Nehézfém expozíció hatása két hemoxigenáz gén és egyéb antioxidáns markerek kifejeződésére pontyban

1. Fém felhalmozódás májban és vesében

A halakat kétféle nehézfémrel, a toxikus és karcinogén tulajdonságú Cd-mal és As-nel kezeltük, majd a méregtelenítésben kulcsfontosságú szerepet játszó májban és vesében vizsgáltuk ezek felhalmozódását. A Cd-ot és az As-t egy kisebb (1 mg/l) és egy nagyobb (10 mg/l) dózisban és különböző expozíciós ideig (6-72 óra) alkalmaztuk a kezeléseik során. Mindkét fémről elmondható, hogy akkumulációjuk szövet- és dózis-függő. A dózisfüggés ellenére a kezeléseik során alkalmazott 10-szeres dóziskülönbség a felhalmozódás mértékében nem jelentkezett, As esetében ez a különbség például mindössze 1,5-szörös volt. Felhalmozódásuk vesében jelentősebb mértékű volt, mint a májban.

2. A ponty *ho* gének azonosítása és jellemzése

Első lépésként azonosítottuk és jellemtük a *ho* géneket ebben a tetraploid fajban. A *ho-1* és a *ho-2* cDNS amplifikációja során kapott PCR termékpulációk homogének voltak, így megbizonyosodtunk arról, hogy a ponty genom vagy nem hordozza több mint két kópiában a *ho* géneket, vagy ha mégis, akkor a másolatok nem különböznek lényegesen az eredeti géntől. Az általunk meghatározott ponty *ho-1* és *ho-2* szekvenciák nagyfokú homológiát mutattak a többi már ismert hal *ho* génjeivel. A ponty HO-k feltételezett aminosav szekvenciái hordozzák az evolúciósan konzervált doméneket és motívumokat. A filogenetikai analízis során kiderült, hogy a *ho-1* és *ho-2* két jól elkülöníthető csoportba tartozik. Ebben a rendszerben, a *ho-2* tagjai kevésbé tűnnek eltérőnek, így feltételezhetjük, hogy evolúciósan később váltak el a *ho-1* génektől.

Megvizsgáltuk a *ho* gének kifejeződését fiziológiás körülmények között a ponty egyes szerveiben. A *ho-1* mRNS mennyisége a kimutathatóság határán volt a kezeletlen állatok vizsgált szöveteiben, úgymint máj, vese, agy, szív, kopoltyú és izom, kivéve a lépet, a bőrt és vért. A legmagasabb *ho-1* mRNS mennyiséget a lépben mértük, ami összefügghet az immunválaszban és a vérellátásban betöltött funkciójával. A *ho-2* magas szinten expresszáldott az összes vizsgált szövetben; a legmagasabb expressziós szintet a bőrben, lépben és agyban, a legalacsonyabbat a vesében mértük.

3.a. Nehézfém expozíció hatása a ho gének kifejeződésére

A két fém akut expozíciója a két *ho* gén expressziójára eltérő hatással volt, szövet- és stresszor-specifikus indukciót figyelhettünk meg. Szoros összefüggést nem találtunk az expressziós változás és a két szervben akkumulálódó fém mennyisége között.

3.b. Fém-indukálta szabadgyök képződés

A kísérleteink során alkalmazott nehézfémek szövet-specifikusan indukálták a H_2O_2 képződését, mely nagy koncentrációban jelentősen hozzájárul az oxidatív stressz kialakulásához és a makromolekulák károsításához, képződése összefüggésben áll a $\bullet O_2^-$ fokozott termelődésével. As hatására vesében, míg a Cd kezelést követően a májban figyeltük meg fokozott termelődését.

3.c. Az antioxidáns védelmi rendszer aktiválódása

Enzimatis és kis molekulatömegű antioxidánsokat vizsgáltunk fémterhelést követően. A SOD és a KAT enzim aktivitás növekedését tapasztaltuk vesében, ott, ahol a két vizsgált szövet közül nagyobb volt a fém felhalmozódás. A GSH/GSSG arány - mely gyakran a celluláris toxicitás meghatározására szolgál - stresszor- és szövet-specifikus módon változik. Vesében fémspecifikus változásokat figyeltünk meg. A GSH/GSSG arány növekedését a GSH koncentráció emelkedett szintje eredményezte. Ezekben az esetekben a GSSG koncentráció kismértékben csökkent, vagy nem változott szignifikánsan. Az arány csökkenését a GSSG fokozott képződése és a GSH koncentráció kismértékű csökkenése okozta. Mindkét fém esetében elmondható, hogy a kezeléseket követően májban nem volt szignifikáns változás.

3.d. A szövetkárosodás mértéke

Az oxidatív stressz okozta károsodásra utal a fokozott LP. Kísérleteink során szövet-specifikus és dóziszfüggő LP-t figyeltünk meg. Míg az As kis dózisban, addig a Cd nagy dózisban okozott fokozott LP-t. Érdeemes megemlíteni, hogy ahol fokozott LP-t tapasztaltunk, ott volt a legnagyobb a *ho-1* génexpresszió.

B. Az oxidatív stressz markerek és a szöveti károsodások vizsgálata streptozotocin-indukálta diabéteszes patkányok különböző bélszakaszaiban

1.a. A hiperglikémia okozta oxidatív károsodás meghatározása

A STZ-kezelés hatására minden állatban szignifikánsan magas szérumban glükóz koncentrációt mértünk a 10 hetes kísérleti periódus alatt. Elváltozásokat figyeltünk meg a diabéteszes patkányok bélrendszerén: megnövekedett vakbél és lilás elszíneződés, amely gyulladásra vagy ischémiára utalhat. Elektronmikroszkópos vizsgálatainkkal apoptózis és nekrozis jeleit mutattuk ki diabéteszes patkányokban. Diabéteszes modellben a pro- és anti-apoptotikus markerek kifejeződése, valamint a nekrozis előfordulása régió-specifikus volt. A pro- és anti-apoptotikus markerek expressziójának egymáshoz viszonyított aránya duodenumban hozzájárulhat a programozott sejthalál beindításához. Colonban az arány az anti-apoptotikus markerek irányába tolódott el. Itt nekrozis jeleit figyeltük meg, aminek kialakulásához hozzájárulhatott a megnövekedett ROS koncentráció és az antioxidáns védelem aktiválódásának elmaradása.

1.b. Szabadgyök képződés a vizsgált bélszakaszokban

A ONOO^- nagy koncentrációban jelentősen hozzájárul az oxidatív stressz kialakulásához és a makromolekulák károsításához, képződése összefüggésben áll a $\bullet\text{O}_2^-$, valamint a NO fokozott termelődésével. Hiperglikémiás körülmények között a ONOO^- koncentrációja bélszakasz-specifikus módon változott. Diabéteszes patkányok vastagbélben fokozott ONOO^- képződést tapasztaltunk.

1.c. Az antioxidáns védelmi rendszer aktiválódása

Diabéteszes patkányokban bélszakasz-specifikus változásokat mértünk. Vastagbélben, ahol a ONOO^- koncentráció emelkedését tapasztaltuk, csökkent a SOD aktivitás.

A kis molekulású antioxidánsok közül vizsgáltuk a GSH mennyiségi változását és a GSH/GSSG arányt. A hiperglikémia során duodenumban nőtt és colonban nem változott ez az arány. Az arány növekedése fokozott antioxidáns védelmet jelez, aminek hátterében a GSH megemelkedett koncentrációja áll.

MT-k is kis molekulatömegű antioxidánsok, melyek szintén jelentős szerepet játszanak a tiol/redox egyensúly fenntartásában és az oxidatív stresszel szembeni védekezésben. Vizsgálataink során diabéteszben a *mt* gének szövet-specifikus indukcióját tapasztaltuk. Eredményeink azt mutatják, hogy mindkét

mt gén indukálódása szükséges lehet ahhoz, hogy jótékony hatásukat kifejthessék a hiperglikémia során fellépő káros folyamatokkal szemben.

A HO rendszer stresszorok széles skálájára indukálódik. A diabéteszes modellben bélszakasz-specifikus változásokat mutattunk ki a *ho-k* expressziójában. Duodenumban a *ho-1* gén, míg vastagbélben a *ho-2* gén indukálódott és nagy mennyiségben volt jelen a HO-2 fehérje is. Génexpressziós és immunanalitikai vizsgálataink eredményei alapján úgy tűnik, hogy a modellrendszerünkben lejátszódó válaszreakciókban aktívan részt vehet a HO rendszer aktiválódása is.

2. A diabétesz kialakulását követő azonnali inzulin-kezelés hatása

Az azonnali inzulin-kezelés a hiperglikémiát hatékonyan csökkentette. Elmondhatjuk, hogy az inzulin minden esetben a kontroll szint körül tartotta a vizsgált markerek értékeit mindkét bélszakaszban.

KONKLÚZIÓ

Az oxidatív stressz okozta károsodásokra jellemző fokozott LP és nekrosis összefüggésbe hozható a hemoxigenázok túlzott mértékű indukálódásával. Ahol fokozott LP-t tapasztaltunk, ott volt a legnagyobb a *ho-1* génexpresszió. Nekrosis, amely a szövet pusztulását jelzi, azon a bélszakaszon volt megfigyelhető, ahol a vizsgált antioxidánsok közül csak a HO-2 indukálódott. Patológias körülmények között fokozott a ROS képződés tapasztalható, és az oxidatív környezetben fokozódhat a HO-k aktivitása. Ezáltal a túlzott mértékű HO expresszióknak már káros következményei is lehetnek, melynek hátterében a hemből felszabaduló redox-aktív Fe állhat, ami fokozott gyök képződést eredményezhet. Ez jelentősen hozzájárulhat vizsgált modellrendszerekben megfigyelt károsodásokhoz.

KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

Jancsó Zs, Bódi N, Borsos B, Fekete E, Hermes E. Gut region-specific accumulation of reactive oxygen species leads to regionally distinct activation of antioxidant and apoptotic marker molecules in rats with STZ-induced diabetes. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* (Elbírálás alatt)

Zsanett Jancsó and Edit Hermes (2014) Impact of acute arsenic and cadmium exposure on the expression of two haeme oxygenase genes and other antioxidant markers in common carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Applied Toxicology* 2014 April 7. **IF: 3.174**

Egyéb közlemények

Bódi, Nikolett; **Jancsó, Zsanett**; Talapka, Petra; Pál, Alexandra; Poles, Marietta; Bagyánszki, Mária; Hermes, Edit; Fekete, Éva (2014) Gut region-specific rearrangement of the cellular and subcellular compartments of nitric oxide synthase isoforms after chronic ethanol consumption in rats. *Histology and Histopathology* 29(12):1547-1555 **IF: 2.533**

Dugmonits K, Ferencz A, **Jancsó Zs**, Juhász R, Hermes E (2013) Major distinctions in the antioxidant responses in liver and kidney of Cd²⁺-treated common carp (*Cyprinus carpio*). *Comparative Biochemistry and Physiology C Toxicological Pharmacology* 158(4), 225-230. **IF: 2.829**

N. Bódi, I. Battonyai, P. Talapka, E. Hermes, **Zs. Jancsó**, Z. Katarova, F. Izbéki, T. Wittmann, É. Fekete, M. Bagyánszki (2012) Diabetes-related structural, molecular and functional alterations in capillaries supplying the myenteric plexus in the gut of the streptozotocin-induced diabetic rats. *Microcirculation* 19(4), 316–326. **IF: 2.763**

Szabolcs Ábrahám, Edit Hermes, Andrea Szabó, Ágnes Ferencz, **Zsanett Jancsó**, Ernő Duda, Magdolna Ábrahám, György Lázár, György Lázár Jr. (2012) The effects of Kupffer cell blockade on the hepatic expression of metallothionein and heme oxygenase genes in endotoxemic rats with obstructive jaundice. *Life Sciences* 90(3–4), 140–146. **IF: 2.296**

Zsuzsanna Máté, Andrea Szabó, Edit Paulik, Edit Hermes, **Zsanett Jancsó**, András Papp (2011) Electrophysiological and biochemical responses in rats on intratracheal instillation of manganese. *Central European Journal of Biology* 6(6), 925-932. **IF: 0.685**

Összesített impakt faktor: 14.28

Nyomtatásban megjelent konferencia kivonatok

N. Bódi, P. Talapka, **Zs. Jancsó**, M. Poles, E. Hermes, M. Bagyánszki, É. Fekete, F. Izbéki, T. Wittmann Gut region-specific differences in the cellular and subcellular distribution of nitric oxide synthase isoforms after chronic ethanol exposure in rats. 20th United European Gastroenterology Week Amsterdam, The Netherlands October 20-24, 2012 *Gut* Supplement No III Vol 61, A304 **IF: 10,732**

Juhász, R., Ferencz, A., **Jancsó, Z.**, Dugmonits, K., & Hermes, E. Comparative study on the expression of glutathione peroxidase, glutathione reductase, glutathione synthetase and metallothionein genes in common carp during cadmium exposure. Society for Free Radical Research International 16th Biennial Meeting, London, 6-9 September 2012. *Free Radical Biology and Medicine* 53(1), 2. **IF: 5.271**

Zsanett Jancsó, Krisztina Dugmonits, Edit Hermes Metal-induced alteration in the expression of two heme-oxygenase genes. FEBS 3+Meeting, Opatija, Croatia / 13 - 16 June 2012 (PIII-140)

Zsanett Jancsó, Nikolett Bódi, Éva Fekete and Edit Hermes Oxidative stress response in different gut segments of a streptozotocin-induced diabetic rat model. 36th FEBS Congress "Biochemistry for Tomorrow's Medicine" Torino, 25-30 June 2011 (P 26.28) *FEBS Journal* 278: 74-445 **IF: 3.79**

Máté Zs, Szabó A, Hermes E, **Jancsó Zs**, Boros I. Mangán intratracheális adagolásával előidézett funkcionális idegrendszeri eltérések patkányban. A MÉT LXXIV. Vándorgyűlése, Szeged 2010. *Acta Physiologica Hungarica* 97, 456-457 **IF: 1.226**

Máté Zs., Szabó A., Hermes E, **Jancsó Zs.**, Boros I. Alterations in the central nervous system caused by intratracheal instillation of Mn, in aspects of neurophysiology and molecular biology. The regional committee of the hungarian academy of sciences at Szeged 2010 October 13-15 ISIRR 11th international symposium interdisciplinary regional research, Szeged. p. 100. ISBN: 978-963-508-600-9

Ábrahám S., Hermes E., Szabó A., Simonka Z., **Jancsó Zs.**, Lázár G., Boros M., Lázár Jr G.: The effect of Kupffer cell blockade on the hepatic and renal expression of heme oxygenase genes after biliary obstruction combined with sepsis. The 44th Congress of the European Society for Surgical Research, Nimes, France, 20–23 May 2009 *British Journal of Surgery* 96(S5): 1-72 **IF: 4.077**

NYILATKOZAT

Alulírott nyilatkozom, hogy a jelölt téziseit ismerem, a tézisekben foglalt tudományos eredményeket PhD fokozat megszerzéséhez nem használtam fel és azokat ilyen célból a jövőben sem fogom használni. Elismerem, hogy Jancsó Zsanettnek az alábbi közlemények eredményeinek elérésében meghatározó fontosságú szerepe volt, így a közlemények anyagát Ph.D. értekezésében felhasználhatja.

Jancsó Zsanett PhD munkájának témavezetőjeként igazolom, hogy a tézise az általa végzett munka eredményeit tükrözi és Ph.D. értekezéséhez felhasznált közlemények létrehozásához jelentős mértékben hozzájárult:

Jancsó Zs, Bódi N, Borsos B, Fekete E, Hermes E. Gut region-specific accumulation of reactive oxygen species leads to regionally distinct activation of antioxidant and apoptotic marker molecules in rats with STZ-induced diabetes. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* (Elbírálás alatt)

Zsanett Jancsó and Edit Hermes (2014) Impact of acute arsenic and cadmium exposure on the expression of two haeme oxygenase genes and other antioxidant markers in common carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Applied Toxicology* 2014 April 7.

Dr. Hermes Edit

felelős szerző