

A metán bioaktivitása és kölcsönhatásai más biológiai gázokkal

Dr. Mészáros András

**Szegedi Tudományegyetem,
Sebészeti Műtéttani Intézet**

Ph.D. értekezés tézisei

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

Témavezetők:

Prof. Dr. Boros Mihály, D.Sc.

Szegedi Tudományegyetem, Sebészeti Műtéttani Intézet

Dr. Andrey V. Kozlov, Ph.D.

**Ludwig Boltzmann Institute for Experimental and Clinical Traumatology
Bécs, Ausztria**

2017

Az értekezés alapjául szolgáló, lektorált folyóiratban megjelent tudományos közlemények

- I. **Mészáros AT**, Büki T, Fazekas B, Tuboly E, Horváth K, Poles MZ, Szűcs Sz, Varga G, Kaszaki J, Boros M: Methane inhalation preserves the epithelial barrier during ischemia and reperfusion in the rat small intestine. *Surgery*, 2017. (közlésre elfogadva) **IF: 3,309**
- II. Tuboly E*, **Mészáros A***, Boros M: Nonbacterial biotic methanogenesis, possible mechanisms and significance. In: *Methanogenesis: Biochemistry, Ecological Functions, Natural and Engineered Environments*. Badalians G.G. (ed.). Nova Science Publishers, Inc. NY, USA 2014, Chapter 2, pp. 19-49. ISBN 978-1-63321-567-2. ***Megosztott első szerzők**
- III. Dumitrescu SD*, **Meszáros AT***, Puchner S, Weidinger A, Boros M, Redl H, Kozlov AV: EPR analysis of extra- and intracellular nitric oxide in liver biopsies. *Magnetic Resonance in Medicine*, 2016. (Epub ahead of print) *** Megosztott első szerzők IF: 3,782**
- IV. Boros M, Tuboly E, **Mészáros A**, Amann A: The role of methane in mammalian physiology – is it a gasotransmitter? *Journal of Breath Research*, 2015; 9: 014001 **IF: 4,177**
- V. Kaszaki J, **Mészáros A**, Büki T, Varga G, Érces D, Boros M: Pathophysiology of intestinal ischemia and reperfusion – novel therapeutic possibilities. *Magyar Belorvosi Archívum*, 2013; 66: 6-12.
- VI. Kozlov AV, Bernardi P, Lancaster J, **Meszáros AT**, Weidinger A: Mitochondrial pathways linking acute inflammation and liver failure, a hypothesis about key role of mitochondrial ROS. **Közlésre beküldve**

Az értekezés témájához kapcsolódó, lektorált folyóiratban megjelent tudományos közlemények

- I. Tuboly E, Futakuchi M, Varga G, Érces D, Tőkés T, **Mészáros A**, Kaszaki J, Suzui M, Imai M, Okada A, Okada N, Boros M, Okada H. C5a inhibitor protects against ischemia/reperfusion injury in rat small intestine. *Microbiology and Immunology*, 2016; 60(1): 35–46. **IF: 1,428**
- II. 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*, 2016; 11(1): e0146363 **IF: 3,057**
- III. Érces D, Nógrády M, Varga G, Szűcs S, **Mészáros AT**, Fischer-Szatmári T, Cao C, Okada N, Okada H, Boros M, Kaszaki J. Complement C5a inhibition improves late hemodynamic and inflammatory changes in a rat model of non-occlusive mesenteric ischemia. *Surgery*, 2016; 159(3): 960-71 **IF: 3,309**

Kumulatív IF: 19,062

I. Bevezetés

1. Az oxigén és az aerob élet

A gerinces élőlények legtöbb szövettípusában az oxigén (O_2) legnagyobb felhasználói a mitokondriumok, a sejtek „erőművei”. E sejt szervecskéiben a légzési lánc fehérjekomplexei oxidoreduktív reakciók sorához kapcsolatosan protonokat pumpálnak, miközben elektronokat juttatnak a citokróm c oxidáz enzimhez, amely a végső elektron akceptor oxigén molekulát vízzé redukálja. Ez a reakció az emberi test oxigénfogyasztásának több mint 90 százalékáért felelős. Az oxidációs-redukciós lépésekkel a mitokondrium belső membránon keresztül pumpált protonok által létrehozott elektrokémiai gradiens az ATP szintézis hajtóereje.

Az elektron transzport során részlegesen redukált szuperoxid gyök ($O_2^{\bullet-}$) is képződik, mely az elsődleges reaktív oxigén származék (ROS) az eukarióta sejtben (Chance és *mtsai*, 1961). Ma mintegy 10 mitokondriális enzimről ismert, hogy képes ROS termelésre (Andreyev és *mtsai*, 2005; Quinlan és *mtsai*, 2012). Maga a ROS termelés szorosan szabályozott és antioxidáns védelmi mechanizmusok sorával kordában tartott folyamat. Napjainkban általánosan elfogadott, hogy az élettani mennyiségben képződő ROS számos jelátviteli lépést szabályoz direkt és indirekt módon (pl. az NF- κ B, Nrf-2, STAT3 útvonalat) (Hamanaka és *mtsai*, 2010; Niture és *mtsai*, 2014; Weidinger és *mtsai*, 2015).

2. Hypoxia, reoxigenizáció és gyulladás

Az artériás vérellátás károsodása (ischaemia) szöveti hypoxiához vezet, mely gátolja a mitokondriális oxidatív foszforilációt. A mitokondriális funkciók zavara központi tényező a hypoxiás szövetkárosodás kialakulásában. A diszfunkció mind a csökkent ATP szintézisben és a mitokondriális membránpotenciál ($\Delta\psi_m$) fenntartása érdekében megnövekedett ATP hidrolízisben, mind a rosszul szabályozott mitokondriális Ca^{2+} homeosztázisban, túlzott ROS termelésben és mitokondriális permeabilitás tranzícióban megnyilvánulhat (Di Lisa és *mtsai*, 2006; Bernardi és *mtsai*, 2015).

Az ischaemia hossza meghatározza az érintett szövet túlélését, ezért a vérellátás mielőbbi helyreállítása elengedhetetlen a szervfunkció megmentéséhez. Azonban maga a reperfüzió is okozhat károkat, paradox módon súlyosbíthatja a kezdeti, ischaemia alatt kialakult folyamatokat. Ennek magyarázata főként a molekuláris O_2 újbóli belépése az előzőleg még oxigénhiányos szövetbe, mely felborítja a ROS termelés és semlegesítés közötti egyensúlyt (Granger és *mtsai*, 1981). A reperfüzió alatti kóros ROS képződéshez mitokondriális, citoplazmatikus és extracelluláris folyamatok is hozzájárulnak. A postischaemiás szövetek valószínűleg legfontosabb ROS forrása a xantin-oxidoreduktáz (XOR) enzim (Harrison, 2002; Khambata és *mtsai*, 2015).

A hypoxiával járó állapotok gyulladást okoznak és fordítva, a gyulladós folyamatokat is gyakran kíséri szöveti hypoxia. Az ischaemia-reperfüziós (IR) károsodást is gyulladós válaszreakció kíséri, a veleszületett immunrendszer aktivációja az oxidatív szövetkárosodás egyik

fontos, súlyosbító tényezője. A „gyulladásos mediátor” kifejezés a gyulladás kialakulásában, továbbvitelében és szabályozott lecsengésében résztvevő molekulákra és sejtekre alkalmazott gyűjtőfogalom. A mediátor molekulák legtöbbször szolubilis, mint pl. a citokinek, kis fehérjék, de a ROS mellett más gázmolekulák, mint a nitrogén monoxid (NO), a szénmonoxid (CO) és a kénhidrogén (H₂S) is a gyulladásos mediátorok sorába tartoznak (Liu és mtsai, 2012).

A reperfúziós károsodás további fontos jellemzője a no-reflow jelenség. ROS és más oxidáló ágensek, mint pl. a peroxinitrit (ONOO), a membrán lipidek peroxidációjával csökkentik a vörösvérsejtek (vvs) deformabilitását, ami csökkent kapilláris keringést, súlyos esetekben kapilláris stasist okozhat (Dobretsov és mtsai, 1977; Vollmar és mtsai, 2011).

3. A vékonybél ischaemia-reperfúziós károsodása és a mucosa epithelialis barrier

Mind az okkluzív, mind a nem-okkluzív eredetű mesenterialis ischaemia és az ezt követő reperfúzió a nyálkahártya oxidatív sérülésével jár, ami a biológiai membránok visszafordíthatatlan strukturális károsodásához vezethet. E folyamat során a permeabilitás növekedése miatt baktériumok és toxinjaik juthatnak a bél lumenéből a vérkeringésbe. A mucosa metabolikusan igen aktív, azonban az O₂ szint a bél lumenben meglehetősen alacsony (Levitt, 1971; Glover és mtsai, 2016) és az interepithelialis zárórendszer részeit képező tight junction (TJ) működéséhez és a nyálkahártya szelektív átteresztőképességének folyamatos fenntartásához állandó energiaellátás szükséges. Az ATP szint csökkenése (pl. mesenterialis ischaemia alatt) a TJ fehérjék felbomlásához vezet, de a meglévő TJ visszanyerheti működőképességét, ha az ATP koncentráció rövid időn belül normalizálódik (Tsukamoto és mtsai, 1997; Bush és mtsai, 2000).

A lipopolyszacharid (LPS) endotoxin a bélrendszerben nagy mennyiségben jelen levő Gram-negatív baktériumok sejtfalának alkotója. Az LPS jelentős szerepet játszik a csökkent keringéssel járó állapotok és IR után a bélből kiinduló szisztémás gyulladás, szepszis és többszervi elégtelenség kialakulásában (Olofsson és mtsai, 1985). Az LPS hatásait a Toll-like receptorokon (TLR) keresztül fejti ki, és számos TLR4-et expresszáló sejttypusban igazolták, hogy a sejtes stressz-válasz részeként O₂^{•-} és NO is termelődik (Mittal és mtsai, 2014; Vaure és mtsai, 2014).

4. Biológiailag aktív gázok

A gáznemű jelátviteli molekulákat négy fő jellegzetesség alapján definiálják: kémiai felépítésüket tekintve egyszerűek, mindenhol rendelkezésre állnak, illékonyak és biológiai hatással bírnak. E jellegzetességek mellett Wang további hat kritériumot fogalmazott meg, a következők szerint: (1) kis gázmolekulák, (2) szabadon közlekednek membránokon át, (3) emlős sejtekben endogén úton, meghatározott szubsztrátokból enzimatikusan képződnek, (4) jól meghatározott, specifikus funkcióval bírnak élettanilag releváns koncentrációban is, (5) hatásuk utánozható exogén

forrásból származó megfelelőjükkel és (6) specifikus sejtes és molekuláris célpontjaik vannak. Napjainkban az NO mellett a H₂S és a CO a legismertebb gáztranszmitter molekula (Wang, 2014).

4.1. NO

Az NO párosítatlan elektronja miatt szabadgyöknek tekinthető. Mivel töltéssel nem rendelkezik, a biológiai membránokat könnyen átlépve minden irányban passzívan diffundálhat. Normoxiás körülmények között a NO-t főként a NO-szintáz enzim izoformái termelik (iNOS, nNOS, eNOS). Vazodilatatív hatásán túlmenően a NO számos élettani szereppel bír a sejtes jelátviteli mechanizmusokban (Hirst és *mtsai*, 2011). Élettani hatásainak túlnyomó részét a szolubilis guanilát-cikláz aktivációja, s így a cGMP szint növelése útján fejt ki (Toledo és *mtsai*, 2012).

4.2. Metán (CH₄)

A CH₄ a szén teljesen redukált formája, a legkisebb szerves molekula, a legegyszerűbb alkán. Apoláros molekula lévén oldékonysága a membránalkotó lipidekben két nagyságrenddel nagyobb, mint a vizes fázisban (Miller és *mtsai*, 1977; Meyer és *mtsai*, 1980). Ha az O₂ szállítás súlyos mértékben nem akadályozott, élettanilag releváns koncentrációban nem toxikus. Földi körülmények között a CH₄ reakciókészsége alacsony, de a troposzférában hidroxyl gyökök szén-dioxiddá (CO₂) oxidálják (Cantrell és *mtsai*, 1990; Hurkuck és *mtsai*, 2012).

A legtöbb emlős emésztőrendszerében a szénhidrátok erjedése során felszabaduló CO₂-t az obligát anaerob prokarióta, metanogén Archea törzsek metánná redukálják (Conrad és *mtsai*, 1999). A termelődött gáz ezt követően részben mint flatus, részben a bőrön át távozik, vagy a humán populáció mintegy harmadában a kilélegzett levegőben is mérhető (Nose és *mtsai*, 2005; de Lacy Costello és *mtsai*, 2013). A CH₄ nem-bakteriális képződését először Ghyczy és munkatársai mutatták ki eukarióta mitokondriumokban (Ghyczy és *mtsai* 2003). Később bebizonyosodott, hogy oxidoreduktív stresszállapotokban CH₄ szabadul fel sejt kultúrákban, valamint állati és növényi *in vivo* körülmények között is (Ghyczy és *mtsai*, 2008; Wishkerman és *mtsai*, 2011; Keppler és *mtsai*, 2016).

Az utóbbi időben jelentős figyelem összpontosult a CH₄ biológiai aktivitására és lehetséges terápiás felhasználására. A CH₄ biológiai hatását emlősökben először Pimentel és munkatársai bizonyították (Pimentel és *mtsai*, 2006). Eredményeik szerint a CH₄ lassítja a bél propulzív motilitását és növeli a simaizom kontrakciókat. A kilélegzett levegőben kimutatható CH₄ és a bélperisztaltika változásai közötti összefüggést irritábilis bél szindrómában, humán vizsgálatokban is igazolták (Lee és *mtsai*, 2013; Pozuelo és *mtsai*, 2015). A CH₄ gyulladásgátló hatását először Boros és munkatársai bizonyították kísérletes mesenterialis IR során (Boros és *mtsai*, 2012). Az elmúlt években számos további közlemény született a CH₄ gyulladásgátló tulajdonságáról IR, hypoxia és steril gyulladás különböző állatkísérletes modelljeiben. A legtöbb közlemény a CH₄ bioaktivitásának négy szempontját vizsgálta: (1) a gyulladáshoz vezető citokinek felszabadulásának befolyásolását, (2) anti-

apoptotikus hatásait, (3) az oxidatív stressz biomarkerek változását és az endogén antioxidáns rendszerek aktivitását növelő hatásokat, valamint (4) a javuló szerv-funkciókat (Song és *mtsai* 2015; Chen és *mtsai* 2016; Liu és *mtsai* 2016).

4.3. Az O₂ és más gázok közötti összefüggések, NO hatásai hypoxiában és reperfúzió során

A makro- és mikrokeringés zavarai megváltoztatják a szövetek oxigenizációs mintázatát, függetlenül attól, hogy elsődleges vascularis károsodás vagy másodlagos, gyulladás talaján kialakuló zavar áll-e fenn. A gázok összetett kölcsönhatásai különösen fontosak hypoxiával járó kórállapotokban. Számos O₂-t használó enzim képes más gázokat is megkötni, így O₂ hiányában olyan reakciók kerülhetnek túlsúlyba, melyek élettani körülmények között nem jelentősek.

A NOS izoformák NO termelése O₂-függő. Hypoxia és anoxia alatt NO képződhet nitritből (NO₂⁻) és nitrátból (NO₃⁻) is redukcióval, utóbbi úton NO₂⁻ köztesterméken keresztül. Emberben az egyik fő NO₂⁻ redukáló enzim a XOR. A hypoxia alatt nitritből történő NO képzést mentő útvonalnak tekintik (Dalsgaard és *mtsai*, 2007). A reperfúzió alatt képződő ONOO és a NO káros hatásai legtöbbször összefonódnak. A ONOO és belőle képződő gyökök (pl. lipid hydroperoxidok) könnyen oxidálják és/vagy nitrálják a biomolekulákat, tirozin reziduumokat, tiolokat, DNS-t vagy telítetlen zsírsav tartalmú foszfolipideket.

Emlősökben a CH₄ és a NO esetleges kölcsönhatásait még nem vizsgálták szisztematikusan, de korábbi vizsgálatok bizonyították, hogy IR alatt a CH₄ belélegeztetés csökkenti a szöveti tirozin nitrációt (Boros és *mtsai*, 2012). Fontos továbbá, hogy CH₄ felszabaduláshoz vezet a mitokondriális citokróm c oxidáz (komplex IV) gátlása, mely hypoxia alatt az NO célpontja (Wishkerman és *mtsai*, 2011; Tuboly és *mtsai*, 2013). Mindezek alapján felmerülhet, hogy a CH₄ modellrendszerekben kifejtett hatásainak egy része a NO funkciók indirekt befolyásolásával magyarázható, továbbá az is, hogy a két gáz befolyásolhatja egymás hatásait olyan membrán felületeknél, ahol koncentrációjuk a legmagasabb.

II. Célkitűzések

1. Egyik fő célunk a normoxiás CH₄ bevitel hatásainak és következményeinek vizsgálata volt IR által okozott gyulladáshoz vezető reakció alatt. Ehhez az alábbi konkrét célokat tűztük ki:

- Első célunk az epitheliális és endotheliális permeabilitás-változások jellemzése volt patkány vékonybél IR modellben. Ennek részeként az IR korai és késői biokémiai változásait, strukturális és haemodinamikai következményeit is megvizsgáltuk a vékonybél nyálkahártyában.
- Másodikként az exogén CH₄ kezelés lehetséges hatásmechanizmusának vizsgálatához az oxidatív és nitrozatív stressz biokémiai jelzőmolekuláit vizsgáltuk és azonosítottuk.

- Harmadik célkitűzésünk azon a hipotézisen alapult, hogy a CH₄ közvetlenül képes a sejtmembrán-rigiditás befolyásolására. Megvizsgáltuk a CH₄ *in vitro* hatását az oxidatív stressz által kiváltott vörösvérsejt deformabilitás változásokra.

2. Másik fő célunk a CH₄ hatásmechanizmusának további részleteinek feltárása volt szöveti hypoxiával, valamint fokozott ROS és reaktív nitrogén származék (RNS) képzéssel jellemzett modellekben. Ennek során a CH₄ egyéb gázokkal (NO) való kölcsönhatásaira fektettünk külön hangsúlyt. A következő konkrét célokat tűztük ki:

- A gyulladás endotoxin alapú, *in vivo* kísérleti modelljében a lokálisan képződő NO szint vizsgálata; az NO meghatározás specifikus és kellően érzékeny módszerének kidolgozása és validálása.
- A CH₄ és a NO lehetséges kölcsönhatásainak feltárása, az *in vivo* és *ex vivo* CH₄ kezelés NO termelésre gyakorolt hatásának közvetlen vizsgálata elektron paramágneses rezonancia (EPR) és valós idejű kemilumineszcencia segítségével.

III. Anyagok és módszerek

1. CH₄ hatása mesenterialis IR állatkísérletes modelljében

1.1. Kísérleti protokoll

A kísérletekhez hím Sprague-Dawley patkányokat használtunk fel az Európai Unió 2010/63. tudományos célra használt állatok védelméről szóló direktívája betartásával. A vizsgálatokat az Állatkísérleti Tudományos Etikai Tanács V/148/2013. sz. engedélye alapján végeztük. Az első kísérletsorozatban („korai reperfúziós vizsgálatok”) az állatokat 60 perccel a mesenterialis vérkeringés helyreállítása után, míg a második kísérletsorozatban („késői reperfúziós vizsgálatok”) a reperfúzió 180. percében termináltuk. Az első csoport álműtött kontrollként szolgált, a második (IR) csoportban az arteria mesenterica superior (AMS) vérkeringését 45 percre kirekesztettük, a csoportban (IR+CH₄) az állatok mesterséges, 2,2% CH₄, 21% O₂ és 76,8% N₂ tartalmú gázkeveréket lélegeztek be a 45 perces ischaemia utolsó 5 és a reperfúzió első 10 percében.

1.2. Nyálkahártya permeabilitás vizsgálatok

Az epitheliális permeabilitás (EP) meghatározása Cuzzocrea és *mtsai* (fluorescein-izotiocianát (FITC)-dextrán - FD4) módszerével történt, az EP indexet a vékonybél lumenben és a vérplazmában mérhető FD4 koncentrációk százalékos arányaként fejeztük ki. A vascularis permeabilitási (VP) indexet Evans-kék azo-festék módszerrel (Szentpáli és *mtsai*, 2001) határoztuk meg, a VP indexet a szöveti és vérplazma Evans-kék koncentráció százalékos arányaként definiáltuk.

1.3. Morfológiai vizsgálatok

A reperfüzió 30. percében teljes vastagságú ileum mintákat vettünk, haematoxylin-eozin festés után a metszeteket 40x nagyítású objektívhez csatlakoztatott digitális kamerával értékeltük. A terminális ileum felületi epithelium károsodásának vizsgálata fluoreszcens konfokális lézer scanning endomikroszkópiával (CLSEM) történt. A mucosalis felszint feltártuk és acriflavin fluoreszcens festék helyi alkalmazás után, a nem átfedő látóterekről készített felvételeket szemikvantitatív pontrendszer szerint értékeltünk (Érces és *mtsai*, 2016).

1.4. Haemodinamikai vizsgálatok

Az AMS áramlást folyamatosan mértük számítógépes adatfeldolgozó rendszerrel. Az ileum serosa mikrokeringés vizsgálatára intravitális orthogonális polarizációs spektrális képalkotó rendszert használtunk, a vörösvértest sebesség meghatározása a posztkapilláris venulákban off-line, számítógéppel támogatott képfeldolgozó rendszerrel történt.

1.5. Biokémiai vizsgálatok

A myeloperoxidáz (MPO) aktivitást, a szöveti leukocyta-infiltráció indikátorát ileum minták homogenizátumában Kübler módosított eljárása alapján határoztuk meg (Kuebler és *mtsai*, 1996). A vérplazma ET-1 koncentrációját a késői reperfüziós vizsgálatok végén ELISA módszer segítségével határoztuk meg és fmol/ml-ben fejeztük ki. A $O_2^{\bullet-}$ termelés sebességét friss vékonybél mintákból, lucigenin-erősített kemilumineszcenciával (Ferdinandy és *mtsai*, 2000) mértük. A szabad nitrotirozin (NTyr) szintet, a ONOO termelés indikátorát, ELISA segítségével határoztuk meg vékonybél szövetből, fehérje tartalomra vonatkoztattuk és ng/mg mértékegységben fejeztük ki.

1.7. A CH₄ szint mérése

A szöveti CH₄ koncentrációt külön kísérletsorozatban, altatott patkányokban, szobalevegő vagy 2,2% CH₄ tartalmú levegő belélegzése után, több időpontban vizsgáltuk fotoakusztikus spektroszkópia (PAS) módszerével (Tuboly és *mtsai*, 2013). A méréshez alkalmanként 200 mg súlyú ileum biopsziát, illetve 1 ml vért vettünk, majd a szövetmintát a PAS készülékhez csatlakoztatott küvettaiba helyeztük. A szöveti CH₄ szinteket a háttér CH₄ értékével korrigáltuk és ppm (parts-per-million) egységben fejeztük ki.

2. *In vitro* és *ex vivo* vizsgálatok a NO felszabadulás mérésére

2.1. A kísérleti protokoll, LPS kezelés

Az EPR spektroszkópia vizsgálat dózis-hatás kísérleteihez *Escherichia coli* 026:B6 szerotípusából származó, $\geq 500,000$ EU/mg aktivitású LPS-t használtunk. Patkányok 6 csoportját különböző mennyiségű LPS-sel kezeltük (0,2, 1,3, 2,5, 4,7, 6,3 és 8,5 mg/kg), míg a kontroll csoport fizioológias sóoldatot kapott. A kezeléseket követően 16 órával később szövetmintákat vettünk az állatokból.

2.2. EPR spektroszkópia

Az EPR spektrumokat a rövid és hosszú skála tartományban, folyékony nitrogén hőmérsékleten vettük fel. Az alapbeállítások a rövid tartományban a következők voltak: modulációs frekvencia: 100 kHz, mikrohullámú frekvencia: 9,425 GHz, mikrohullám energia: 8,3 mW, a moduláció amplitúdója: 5 G, erősítés: 200. Az NO–Hb komplexeket 3300±200 G értéknél rögzítettük. A beállítások a hosszú tartományban a következők voltak: modulációs frekvencia: 100 kHz, mikrohullámú frekvencia: 9,429 GHz, mikrohullám energia: 30 mW, a moduláció amplitúdója: 6 G, erősítés: 200. A máj szövet spektrumát 3200±500 G értéknél rögzítettük. A jeleket a nagyságuk meghatározásával, illetve az EPR spektrum különböző komponenseinek kettős integrálásával számszerűsítettük.

2.3. A NO megkötése

CH₄ kezelt patkányokban a vékonybél szöveti vas-kötött NO szintjeit Kozlov módszerével vizsgáltuk (Kozlov és *mtsai*, 2001). Az állatok az AMS elzárása előtt nátrium-dietilditiokarbamát (Na-DETC) és FeSO₄ oldatokat kaptak (sc injekcióval). A DETC vassal vízben nem oldódó Fe-DETC komplexeket képez, melyek a NO megkötése után stabil DETC-Fe-NO komplexeket alkotnak, így lehetővé téve a NO meghatározását képződésének helyén.

2.4. *In vitro* vizsgálat a NO felszabadulás vizsgálatára anoxiás környezetben

Gyorsfagyasztott patkány máj szövetet 1:10 arányban homogenizáltunk 106 mM KCl, 5 mM KH₂PO₄, 20 mM Tris-HCl és 0,5 mM EDTA tartalmú inkubációs pufferben. A máj homogenátból történő NO felszabadulást 37°C-on, anoxiás körülmények között kemilumineszcencián alapuló módszerrel mértük. Az oldat pH értéket 6,0-ra állítottuk be, ezzel ischaemiát és súlyos acidosist szimulálva. A mintákat 10 percen át tiszta nitrogénnel vagy 2,2% CH₄-t tartalmazó nitrogén gázkeverékkel ekvibráltuk. Ezek után 4,4 mM NaNO₂-t adtunk a mintához, és a NO felszabadulást valós időben, 15 percen át mértük.

3. *In vitro* mikrorheológiai vizsgálat

Egészséges humán önkéntesektől származó vénás vért három csoportba osztottunk, majd a vvs aggregáció és deformabilitás mérések előtt 120 percen át, 37°C-on és folyamatos forgatás mellett inkubáltuk. Nem kezelt minta szolgált negatív kontrollként. A minták fenazin-metoszulfáttal (PMS) 120 percen át történő inkubálásával váltottunk ki oxidatív stresszt (Rabai és *mtsai*, 2010). A CH₄ kezelt csoportban PMS inkubáció után a vérminta feletti gázteret 10 percig 2,2% CH₄ tartalmú, normoxiás légkeverékkel perfundáltuk. A vvs deformabilitást ektacytometriával, míg az aggregációs készséget fényáteresztés elvén alapuló aggregometriával vizsgáltuk. Az elongációs indexet (EI) a vvs (hossz – szélesség) / (hossz + szélesség) formula alapján számítottuk 0,5-50 Pa közötti, 9 különböző nyíróerő értéknél meghatározott diffrakciós mintázatból (Hardeman és *mtsai*, 1994). Az aggregáció

mértékét az aggregációs index segítségével jellemeztük, melyet egy 10 másodperces mérés fényintenzitás görbe alatti területéből számítottunk.

4. Statisztikai analízis

Az adatok statisztikai vizsgálatát GraphPad Prism 5.01 for Windows programmal végeztük. Normál eloszlású adatoknál kétszemponos, ismételt méréses varianciaanalízist és Bonferroni-féle post-hoc tesztet, míg a nem normál eloszlású adatok esetében a nemparametrikus Kruskal-Wallis egyutas varianciaanalízist alkalmaztunk Dunn-teszttel kombinálva. A korrelációk vizsgálatára Pearson-féle tesztet használtunk ($p < 0,0001$). A medián, valamint a 75 és 25 percentilis értékeket adtuk meg és a szignifikancia szintjét $p < 0,05$ -nél állapítottuk meg.

IV. Eredmények

1. A CH₄ szállítás kinetikai vizsgálata

A CH₄ koncentráció a nem CH₄-termelő állatok artériás véréből és ileum szövetéből vett kontroll mintáiban a háttér CH₄ szint alatt maradt. Normoxiás CH₄ 5 percig tartó, 300 ml/perc sebességű belélegeztetése után, az AMS ischaemia végén a keringő artériás vérben jelentősen megemelkedett a CH₄ koncentráció és az ileumban is kismértékű emelkedést tapasztaltunk. A reperfúziós fázis 10. percében, a 15 perces CH₄ belélegeztetés végén, az ileum szövetben is emelkedett CH₄ szintet mértünk. A reperfúzió 60. percében (50 perccel a CH₄ kezelés vége után), már sem a vérben, sem a szövetben nem találtunk jelentős CH₄ mennyiséget.

2. A vékonybél permeabilitása

A vékonybél epithelium barrier funkciója

A korai reperfúzióban az EP nem változott az álműtött kontroll állatokban, míg az FD4 plazma szintje meredeken emelkedett az IR csoportban, az epitheliális barrier funkciójának gyors romlását jelezve. A normoxiás CH₄ kezelés jelentősen alacsonyabb EP szinteket eredményezett, amely megőrzött interepitheliális kapcsoló-strukturákra utal. A reperfúzió *későbbi* szakaszában az EP index a nem CH₄ kezelt állatokban is csökkent, a korai fázishoz képest javuló barrier funkciót jelezve. A CH₄ kezelt csoportban a korai reperfúzióhoz hasonló változásokat figyeltünk meg. A kontroll állatokban az EP index a kiindulási értéken maradt.

A vékonybél mikrovaszkuláris barrier funkciója

A reperfúzió korai szakaszában az álműtött állatokhoz viszonyítva megnövekedett Evans kék kiáramlást mértünk, azonban statisztikailag szignifikáns különbségeket nem találtunk a csoportok között sem a korai, sem a késői reperfúziós szakaszban.

Mikro- és makrokeringési változások

Az AMS elzárása előtt mindhárom csoportban hasonló vvs sebességet mértünk az ileum serosa mikroereiben. A reperfúzió 15. percében az IR csoportban a vékonybél mikrokeringése jelentősen károsodott, ugyanakkor az IR+CH₄ csoportban a vvs sebesség nem különbözött az álműtött kontrolltól, megtartott mikrokeringést jelezve. A reperfúzió 120. percére a csoportok közötti különbségek elmosódtak.

Az AMS véráramlását a kísérletek alatt folyamatosan mértük. Az IR és IR+CH₄ csoportokban a vérkeringés teljes kirekesztését követő reperfúzió alatt különböző reakciókat figyeltünk meg. Az IR csoportban az AMS véráramlása jelentősen elmaradt a kiindulási értékektől, ellentétben az álműtött és a CH₄ kezelt csoportokkal. A CH₄ kezelt csoport állataiban az AMS áramlás jelentősen magasabb volt az IR csoporthoz viszonyítva.

ROS és RNS szintek

A szöveti NTyr szintek a reperfúzió 180. percében jelentősen magasabbak voltak az IR csoportban mint az álműtött kontrollokéi, azonban a CH₄ kezelt állatok értékei nem különböztek a kontrolltól. A O₂^{•-} szintjében az ileum mintákban a kísérletek elején nem volt különbség a csoportok között, azonban 15 perccel a reperfúzió kezdete után az IR csoportban mind az álműtött, mind a CH₄ kezelt csoport értékeinél magasabb szinteket mértünk.

ET-1 plazma szint

Az ET-1 koncentráció a reperfúzió végén, az IR csoportban jelentősen emelkedett az álműtött kontrollhoz viszonyítva; a CH₄ kezelés statisztikailag szignifikáns mértékben csökkentette az ET-1 szintet.

Szöveti MPO szint

A polymorphonuclearis (PMN) granulocyták marker enzimének aktivitása a késői reperfúziós fázis végén, mind az IR, mind az IR+CH₄ csoportokban statisztikailag szignifikánsan emelkedett, akut gyulladásra és a leukocyták szövetekbe való kilépésére utalva.

A vékonybél nyálkahártya strukturális integritása

Az álműtött kontroll csoportban a villus morfológia normális volt. Ezzel szemben az IR csoportban általános volt a súlyosan károsodott, az epitheliumtól megfosztott, fokozatosan zsugorodó villusok képe a béllumenben fellelhető törmelékkel együtt, míg a villus kapillárisokban pangó vvs-ek voltak láthatóak. A CH₄ kezelés megőrizte a nyálkahártya integritását a lamina propria enyhe változásai és mérsékelt, lelködött sejtmaradvány képződése mellett.

Az epithelium felszín strukturális állapotának vizsgálatára intravitális CLSEM képeket rögzítettünk. A kontroll csoportban normál villusokat és intakt epitheliumot figyeltünk meg. Az álműtött állatok folytonos, nem megszakított epithelium rétegéhez képest 30 perccel a reperfúzió után súlyosan károsodott nyálkahártya képe mutatkozott, a villusok felszínén végighúzó

epithelium hiánnyal. A CH₄ kezelt csoportban ugyanakkor nem voltak jellemzőek a szakadás-szerű károsodások az epithelium felszínén, és a nem kezelt IR csoporthoz képest szignifikánsan alacsonyabb pontszámot jelzett a károsodási skála.

3. A NO-szint meghatározása EPR spektroszkópiával, exogén spin-csapda molekulák nélkül

A NO szint endogén csapdázó molekulákkal való vizsgálatához EPR spektroszkópiát alkalmaztunk. Az LPS beadása után 16 órával a májban dóziszfüggő módon megemelkedett a $g = 2,075$ és $g = 2,042$ helyzetben található komplexek EPR jele, melyek a haemoglobin-kötött NO (NO-Hb) és vas-kötött NO (NO-Fe) komplexeknek felelnek meg. Ugyanezen állatok vérmintáiból csupán a $g = 2,075$ helyzetben található NO-Hb komplexeket tudtuk kimutatni. A növekvő LPS dózissal jól korreláltak mind az előzőleg kalibrált NO-Hb, mind a NO-Fe jelek. Továbbá az NO-Hb és NO-Fe mértéke között is erős korreláció volt.

4. A CH₄ hatása a NO felszabadulásra ischaemia alatt

A NO szintet patkány duodenumban és ileumban, külsőleg bevitt Na-DETC és vassal képzett, intracelluláris NO-Fe-DETC komplexei formájában, EPR spektroszkópiával vizsgáltuk. Az álműtött kontrollhoz képest a 45 perces ischaemia végén mindkét bélszakaszban magasabb NO szintek mutatkoztak, bár a különbség nem volt szignifikáns. 2,2% CH₄ tartalmú, normoxiás gázkeverék 10 perces belélegzése az ischaemiás csoporthoz képest csökkentette a NO szintet. A reperfüzió alatt nem láttunk hasonló trendet.

Annak megállapítására, hogy a CH₄ képes-e anoxiás szövetekben befolyásolni a NO₂⁻-ből történő NO felszabadulást, máj homogenátot inkubáltunk tiszta N₂ gázzal vagy 2,2% CH₄ tartalmú N₂ keverékkel. A NO termelés csökkent CH₄ jelenlétében, a NaNO₂ hozzáadása utáni 10. perctől kezdve szignifikáns különbséget mutatva a csupán N₂ atmoszférában inkubált csoporthoz képest.

5. A CH₄ hatása teljes vér mikrorheológiai tulajdonságaira

Humán teljes vérből származó erythrocyták deformabilitását lézerfény segítségével működő optikai rotációs módszerrel vizsgáltuk. A vért *in vitro* PMS oxidálószerrel kezelve, az alacsony és közepes nyíróerőnél a nem kezelt kontrollhoz képest jelentősen csökkent elongációs index értékeket mértünk. Az oxidatív stressz után alkalmazott CH₄ kezelés részlegesen visszafordította a vvt-k megnövekedett rigiditását közepes nyíróerőknél vizsgálva. Az *in vitro* oxidatív stressz növelte az erythrocyták aggregabilitását a kontroll csoporthoz képest. CH₄ alkalmazása után ugyanakkor ezek az értékek szignifikáns mértékben, a kezeletlen kontroll minták szintjére csökkentek.

V. Megbeszélés

A hatékony kezelések kulcsa a hatás mechanizmusának megismerése és az eközben megszerzett tudás egy adott molekula élettani szerepét is tisztázhatja. A jelen munkában a CH₄ alapú terápia hatékonyságát vizsgáltuk az oxido-reduktív stressz kisállat modelljében, majd egy második lépésben, *in vitro* vizsgálatokban tettünk kísérletet a lehetséges hatásmechanizmus felvázolására.

1. Az *in vivo* CH₄ szállítás kinetikájának vizsgálata

A NO vagy a H₂S endogén felszabadulásának fokozása prekursor vegyületek bejuttatásával vagy a termelő enzimek serkentésével is lehetséges (Szczesny és mtsai, 2014; Gero és mtsai, 2016). A CH₄ esetében azonban jelenleg a molekula közvetlen bejuttatása az egyetlen lehetséges mód a hatások megismerésére. Vizsgálatainkban normoxiás, mesterséges, 21% oxigént 2,2% metánt tartalmazó légmentes levegőt alkalmaztunk. A CH₄ oldékonysága a lipid fázisban jóval magasabb, a tüdőt az alveolusok és az endothelium közötti vékony szövetréteg alkalmassá teszi a CH₄ vérbe való oldására, a molekula apoláros tulajdonsága miatt a gáz nagy részét a vvs-ek és a lipoproteinek szállítják. Megvizsgáltuk, hogy az *in vivo* kísérletekben az általunk alkalmazott belélegeztetési módszer alatt és után miként változik a szöveti és vérben mérhető CH₄ szint. Igazoltuk, hogy a rövid CH₄ belélegeztetés is jelentős mennyiségű CH₄-t oldott a vérben. Amint a vérkeringés újraindult a szövetben, a gáz szintje jelentősen megnőtt, de az inhaláció befejezése után 50 perccel már nem volt CH₄ a szövetekben. Mindezek alapján feltételezhetjük, hogy a reperfüzió alatt a szisztémás vér CH₄ tartalma azonnal elkezd kiegyenlítődni az előzőleg ischaemiás szövetével, ezáltal is csökkentve az időt, amíg a gáz a sejtekhez jut. Mivel már az ischaemia alatt is a CH₄ szint enyhe emelkedése volt mérhető a vékonybélben – valószínűleg a molekula minden irányba való terjedése miatt – a nem poláros CH₄ molekula keringés nélkül is el tud jutni a szövetekbe, hatását mély hypoxia alatt is kifejtve.

2. Az exogén CH₄ bioaktivitása a vékonybélben

A vékonybél igen érzékeny a hypoxiára, a gasztrointesztinalis keringés-átrendeződések esetén a legsérülékenyebb szervek egyike (Vajda és mtsai, 2004), így ekkor a milieu interieur és a lumen közötti létfontosságú fizikai és immunológiai határfelület gyorsan károsodik. A CH₄ gyulladásgátló tulajdonságait már vizsgálták vékonybél IR-ban (Boros és mtsai, 2012), a jelen vizsgálatokban a folyamat egyik kulcs-tényezőjét, a nyálkahártya barrier funkcióját kívántuk megismerni. Eredményeink bizonyítják, hogy már rövid, 15 percig tartó normoxiás CH₄ belélegeztetés is eredményesen befolyásolja a mucosa permeabilitás epitheliális komponensét, és hatékonyan megelőzi a barrier megszűnését a korai reperfüzió szakaszában.

A 4 kDa molekulatömegű FITC-dextránnal a paracelluláris permeabilitást vizsgáltuk, melyet főként a TJ molekulák szabályoznak (Szabo és mtsai, 2006). A TJ zárt konformációban tartása

energiaigényes folyamat, így a csökkenő celluláris ATP szint növekvő permeabilitással jár (Wattanasirichaigoon és mtsai, 1999). A CH₄ elméletileg gátolhatja a TJ megnyílását a sejtmembrán fluiditásának közvetlen befolyásolásával vagy az intracelluláris ATP szint megőrzésével, továbbá hathat indirekt úton, például NO-függő mechanizmussal. A szöveti NTyr szint csökkenése valóban azt sejteti, hogy a CH₄ a NO-nak a mitokondriális ETS-re gyakorolt gátló hatását akadályozva javíthatja az epithelium barrier funkciót (Brown, 2001). A NO gátlás kiesése következképp növeli az ATP termelést a reperfüzió kezdetén, így segítve hozzá a sejteket megfelelően magas energiaszinthez, amely már elég a TJ molekulák zár konformációban tartásához.

A javuló barrier funkcióval párhuzamosan mind a hagyományos, mint az *in vivo* szövettani vizsgálat a nyálkahártya lumenhez legközelebb eső részének megőrzött szöveti felépítését mutatta. Az epitheliális permeabilitás mérséklődése CH₄ kezelés után csökkent ROS és RNS termeléssel és ET-1 szinttel járt együtt. A CH₄ belélegeztetés javította továbbá a serosa mikrokeringését és az AMS áramlást is, valószínűleg serkentve ezáltal az O₂ eljutását a sejtekhez és a mitokondriális oxidatív foszforilációt. A CH₄ kezelt csoport normalizálódó ET-1 plazma szintje jelezheti a lokálisan javuló keringést, valamint a csökkent gyulladási aktivációt is.

A reperfüzió későbbi szakaszában az ileum epithelialis barrier már részlegesen helyreállt, de adataink alapján a véráramlás és az O₂ ellátás helyreállításának első pillanataiban az endogén védelmi mechanizmusok nem tudják azonnal szabályozni és ellensúlyozni a károsító hatásokat. A terápiás beavatkozásoknak ezeket a korai lépéseket kell megcéloznia, hogy a barrier károsodás hosszú távú és távoli következményeit megelőzhessük. Eredményeink alapján a CH₄ alkalmas erre a célra.

A CH₄ hatása az IR kiváltotta vascularis permeabilitás változásokra kevésbé világos, mivel a keringő endothelialis jelzőmolekula kilépése a szövetekbe nem fokozódott, ezért további mérések szükségesek a CH₄ mikroér permeabilitásra gyakorolt hatásának közvetlen vizsgálatához.

3. A NO meghatározása biológiai mintákban

Feltételezhattuk, hogy a CH₄ átmenetileg felhalmozódhat membrán felületek környezetében, és a más gázokkal (pl. NO) való egyensúly eltolódása enzim-függő folyamatokat, végül a mitokondrium funkciót is befolyásolhatja. Bár a NO élettani és kórélettani szerepéről is sok információval rendelkezünk, biológiai mintákban nehezen mérhető magának a molekulának a pillanatnyi szintje. Jelenleg az EPR spektroszkópia a leginkább alkalmas módszer a NO közvetlen mérésére, a módszer specifikus a NO exogén spincspadakkal (pl. Na-DETC és FeSO₄) alkotott komplexeire. Sajnálatos módon e vegyületek mérgezők, továbbá mivel affinitásuk igen magas, megzavarhatják az endogén NO-t hasznosító jelátviteli utakat is. Lehetséges alternatíva az endogén NO kötő molekulák felhasználása erre a célra. Az intracellulárisan képződő NO vas ionokkal reagálva dinitrosyl-vas

komplexeiket (NO–Fe) képez (Sergent és mtsai, 2005). Ezzel szemben, az érrendszerben a NO mononitrosyl-haemoglobin komplexeiket (NO–Hb) alkot (Gow és mtsai, 1998). Mivel a vérben nincsenek Fe^{2+} ionok, a két jel az EPR spektrum $g = 2.075$ és $g = 2.042$ pozícióiban specifikus a NO–Hb illetve NO–Fe komplexekre.

Intakt, nem kezelt, fagyasztott szövetmintákban kimutattuk, hogy az LPS kezelés a májban mind az intracelluláris, mind az intravasculáris térben dóziszfüggő módon növelte a NO szintet, a szisztémás keringésben pedig a NO–Hb szintet. A természetesen előforduló komplexekben mért NO koncentráció lényegesen alacsonyabbnak bizonyult a specifikus NO csapda vas-dietiltiokarbamáttal intracellulárisan mért és az irodalomban korábban közölt szintekhez képest (Kozlov és mtsai, 2005). Következtetésünk szerint az intracellulárisan képződő NO-nak csupán egy része esik NO–Fe komplexként csapdába, a többlet NO pedig az intracelluláris jelátviteli utakban vesz részt, vagy a vérbe diffundál (Kozlov és mtsai, 2001).

4. A CH_4 és a NO-függő nitrozatív stressz közötti kölcsönhatás

A NO kétélű kard a biológiában. Nanomólos koncentrációban vazorelaxáns és antiadhezív, azonban mikromólos mennyiségben reverzibilis módon gátolja a mitokondriális légzést (Cooper és mtsai, 2007; Cooper és mtsai, 2008). Az ischaemia alatt megemelkedett NO szintet az EPR spektroszkópiával nyert adatok jelzik, CH_4 kezeléssel azonban csökkenthető a NO túltermelés. Fontos megjegyezni, hogy NTyr szint emelkedést észleltünk a bélszövetben, ami a ONOO molekula indikátora, utóbbi $O_2^{\bullet-}$ és NO reakciójaként képződik. A ONOO az ETS fehérjéit nem-specifikusan nitrálva további, nem-reverzibilis gátlást okoz az oxidatív foszforilációban (Brown és mtsai, 2004).

A hypoxia alatt felszabaduló NO forrása a NO_2^- , melyet főként enzimatikus reakciók és kis molekulák redukálnak savas pH mellett NO-vá. Korábbiakban kimutattuk, hogy normoxiás körülmények között a CH_4 gátolja a XOR enzimet. Ennek a hatásnak jelentős szerepe lehet a ROS-indukált károsodás csökkentésében a reperfüzió alatt, amikor a XO az egyik fő ROS termelő enzim. Ugyanez az enzim ugyanakkor NO_2^- reduktázként is működhet hypoxia és alacsony pH értékek mellett, mely feltételek ischaemia alatt teljesülnek.

Mindezeket megfontolva célkitűzésünk szerint valós időben mértünk NO felszabadulást anoxiás körülmények között máj homogenátból *in vitro*, ischaemiás szövetet modellezve. $NaNO_2$, mint NO forrás hozzáadása után az anoxiás CH_4 keverékkel inkubált mintákban a NO termelés üteme jelentősen kisebb volt, mint a csupán nitrogén légkör alatt tartottaké. Az endogén XOR szintek a májban és a vékonybélben hasonlóan magasak. Következésképpen feltételezhetjük, hogy a CH_4 XO-ra gyakorolt szabályzó hatása hozzájárul a vékonybélben mérhető csökkent NO szinthez, azonban más mechanizmusok sem zárhatók ki teljes bizonyossággal.

Összefoglalva, bizonyítottuk, hogy a megnövekedett CH₄ bevitel csökkenti a NO termelést és NTyr szinteket hypoxiás szervekben és szöveti homogenizátumokban anoxia alatt. Látszólag ellentmondás van a hypoxia/anoxia alatt csökkent NO termelés és a reperfüzió alatt javuló mikrokeringés között, de a NO maximális vazodilatatív hatásának eléréséhez jóval kevesebb NO szükséges, mint a citokróm c oxidáz gátlásához.

5. A CH₄ közvetlen hatása az erythrocyta deformabilitásra

A szöveti NTyr szint a megemelkedett ONOO koncentrációval összefüggő protein nitráció indikátora. ONOO a membrán lipidek peroxidációjának potens kiváltója (Hogg és mtsai, 1999), és az IR-val összefüggő lipid peroxidáció számos szövetben (Dobretsov és mtsai, 1977) és erythrocytákban is csökkenti a membrán fluiditást (Watanabe és mtsai, 1990). A vvs alakváltozásaihoz a citoskeleton és a membrán is hozzájárul (Reinhart, 2001). A lipid peroxidáció megszakítja a kapcsolatot a két komponens között (Mohandas és mtsai, 1993), a vvs deformabilitást és aggregációt is károsan befolyásolva (Kayar és mtsai, 2001). Brath és munkatársai patkány mesenterialis ischaemia után, a korai reperfüzió alatt csökkent vvs deformabilitásra és megnövekedett aggregációs készségre utaló adatokat közöltek (Brath és mtsai, 2010). Mivel az erythrocyták kb. 25%-kal nagyobbak, mint az átlagos kapillaris átmérő, a vvs deformabilitás elengedhetetlen az egészséges mikrokeringéshez (Reinhart és mtsai, 1985; Baskurt és mtsai, 2003).

Erre a háttérre alapozva gyűjtöttünk intravitális adatokat az IR alatt károsodott vékonybél mikrokeringésről. A CH₄ belélegeztetés javuló serosa mikrokeringéssel járt, és a kezelés az AMS véráramlást is javította. Feltételeztük, hogy a CH₄ képes befolyásolni a vvs deformabilitást melyek így szabadon haladhatnak keresztül a mikroereken. *In vitro* mikrorheológiai vizsgálatban, humán teljes vérrel, vasoaktív metabolitok zavaró hatása nélkül bizonyítottuk, hogy a lipid peroxidáció csökkenti a vvs elongációt és növeli az aggregációt. Normoxiás CH₄ kezelés után közepes nyíróerők mellett javult a vvs deformabilitás, továbbá a CH₄ javította az aggregációs paramétereket is. Mindez alátámasztja a CH₄ közvetlen hatását a membrán fluiditásra és/vagy a membrán-citoskeleton junkciókra.

VI. A tézis fontosabb megállapításai

Az exogén CH₄ alkalmazásával végzett vizsgálatok megerősítették a korábbi eredményeket a molekula gyulladásgátló hatásáról és adatokat szolgáltatottak a CH₄ hatásmechanizmusának további részleteiről.

1. A CH₄ a tüdőből a keringéssel gyorsan a vékonybélbe jut. Patkányokban 2,2% CH₄ tartalmú normoxiás levegő belélegzése után a vér CH₄ tartalma a kiindulási érték mintegy 2-3-szorosára növekszik, mely elegendő a ROS és RNS termelődés mérsékléséhez.
2. A vékonybél IR mikrokeringési és strukturális károsodása megemelkedett epitheliális permeabilitással jár. Normoxiás CH₄ belélegzése hatékonyan gátolta a permeabilitás növekedését, megőrizte a mucosa strukturális épségét és mérsékelte a gyulladás biokémiai jeleit a korai reperfüzió során. Az adatok igazolják a CH₄ bioaktivitását és az exogén CH₄ gyulladáscsökkentő, nyálkahártya-védő hatását IR alatt.
3. Új, nem toxikus, exogén spincsapda-mentes, EPR spektroszkópos módszert dolgoztunk ki NO mérésére. A módszert ugyanazon szövetbiopsziában történő intra- és extracelluláris NO meghatározásra is validáltuk.
4. EPR spektroszkópiával csökkent NO szintet mutattunk ki vékonybél szövetben *in vivo* normoxiás CH₄ kezelés után, valamint *in vitro*, anoxiás májszövetben CH₄ inkubáció után. Összességében ezen eredmények igazolják, hogy exogén CH₄ alkalmazása csökkenti az ischaemiás szövet NO szintjét.
5. *In vitro* szimulált oxidatív stressz alatt a CH₄ javítja a vörösvérsejtek deformabilitását, mely ezáltal hozzájárulhat a mesenterialis mikrokeringés hatékonyságának javulásához ischaemiát követően.

VII. Köszönetnyilvánítás

Őszinte hálával tartozom Boros Mihály Professzor Úrnak, témavezetőmnek és mentoromnak folyamatos támogatásáért és türelméért a Sebészeti Műtéttani Intézetben töltött éveim alatt. Stimuláló iránymutatása, optimista hozzáállása és az általa megteremtett, óvó légkör tette lehetővé, hogy fejlődjek és kövessem a kíváncsiságomat.

Megkülönböztetett köszönetemet fejezem ki Andrey V. Kozlov egyetemi docens Úrnak, bécsi témavezetőmnek biztatásáért, elméleti és gyakorlati tanácsaiért. Alapos tudása nélkülözhetetlen volt a dolgozat elkészültéhez.

Köszönöm Kaszaki József egyetemi docens Úr segítségét és gyakorlati tanácsait a mindennapokban. Hálás vagyok Varga Gabriellának és Fazekas Borbálának, tudományos diákköri témavezetőimnek segítségükért az egyetemi éveim alatt és után. Külön köszönöm Szabó Andrea egyetemi docens Asszony mindig professzionális, baráti és rendkívül hasznos tanácsait. Köszönöm Büki Tamásnak és Horváth Kittinek, hogy 2008 szeptemberében elvittek a Sebészeti Műtéttani Intézetbe. Akkor kezdődött minden.

Elismeréssel tartozom Adelheid Weidingernek értékes támogatásáért és segítségéért. Köszönöm Sergiu D. Dumitrescunak, a nagyszerű barátnak és kiváló kollégának, hogy mellettem volt nehéz időkben és az önfeledt pillanatokban egyaránt.

Rendkívüli hálával tartozom Heinz Redl és Soheyl Bahrami Professzor Uraknak, a Ludwig Boltzmann Kísérletes és Klinikai Traumatológiai Intézet igazgatójának és igazgatóhelyettesének, Marcin F. Osuchowski-nak és Peter Dungenek bécsi munkám folyamatos és nagyvonalú támogatásáért.

Nagyon köszönöm Tretter László Professzor Úrnak és munkacsoportjának, hogy belém oltották a mitokondriumok csodálatos világának szeretetét.

Ez a munka nem jöhetett volna létre munkatársaimnak, az együttműködő kutatóknak és az SZTE ÁOK Sebészeti Műtéttani Intézet, a Ludwig Boltzmann Kísérletes és Klinikai Traumatológiai Intézet (Bécs) és a PTE ÁOK I. sz. Belgyógyászati Klinika dolgozóinak erőfeszítései nélkül. Külön köszönöm Stefan Puchner és Tanja Stögerer szakképzett segítségét.

Végül, legfontosabbként, köszönöm szüleimnek és családomnak sohasem múló bátorítását és bizalmát. Céljaimat sosem érhettem volna el egy ilyen erős háttér nélkül.

A dolgozat az Országos Tudományos Kutatási Alapprogramok OTKA K104656 valamint a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal NKFI K120232 és GINOP-2.3.2-15-2016-00015 pályázatainak támogatásával készült el.