

# **Hypoxia-induced methane generation *in vivo* and *in vitro*: mechanism and significance**

Ph.D. Thesis

Csilla Torday

Institute of Surgical Research

Szent-Györgyi Albert Medical and Pharmaceutical Center, University of Szeged

2008

Szeged, Hungary

## BEVEZETÉS

A földi eredetű metán 99%-a biológiai eredetű. Ennek nagy részét az ún. metanogén baktériumok termelik. A légkörbe kerülő metánnak mindössze harmada származik természetes forrásból (mocsarokból, erdőtüzekből, szénbányákból illetve az óceánok mélyéből), kétharmada pedig emberi eredetű (fosszilis energiahordozók, talajégetések, komposztáló telepek). A széndioxid után a második legfontosabb üvegház hatásért felelős gáz a metán, amelynek a troposzférából történő eltávolításában a hidroxil szabadgyök jelentős szerepet játszik.

A szervezet redox egyensúlyának felborulása redukzív ill. oxidatív stresszhez vezet. Hypoxiás állapotban, amikor az elektron akceptor oxigén molekula nincs elegendő mennyiségben jelen, a fellépő redukzív túlsúly az ATP koncentráció csökkenéséhez majd végül progresszív strukturális és funkcionális változásokhoz vezet. A biokémiai redukzív stressz (redukatív túlsúly) klinikai-kórtani fogalmi megfelelője az ischemia, amikor az elégtelen vérellátás következtében a szöveti oxigén koncentráció lecsökken. Az ischemia molekuláris kaszkád eseményeket triggerel, melyek következménye a csökkent ATP koncentráció, megváltozott  $\text{Ca}^{2+}$  homeosztázis, mitokondriális diszfunkció, ill. gyulladásos folyamatok aktivációja. A vérellátás helyreállításával (reperfúzió), az oxigén visszapótlása megtörténik, a folyamat ugyanakkor oxidatív stresszt, oxigén eredetű szabadgyökök kóros mértékű felszabadulását eredményezi. Az „oxidatív stressz” alapját tehát az oxigén részleges redukciója során képződő szuperoxid gyök képezi.

Az oxido-redukív stressz és az azzal járó károsodások számos betegség, így pl. az atheroszklerózis, autoimmun betegségek, neuronális károsodások és daganatok kialakulásában játszanak szerepet - a védekezés lehetőségeinek feltérképezése a mai kor kutatóinak egyik legfontosabb feladata.

### **A kutatási téma kiválasztásában a következő tényezők játszottak szerepet**

- Ismereteink szerint meglepően csekély azon endogén gyökfogyó molekulák száma, melyek az egyik leginkább káros szabadgyök, a hidroxil gyök hatása ellen védik a szervezetet.
- Számos jel mutatott arra, hogy a redukzív, majd azt követő oxidatív stressz kóros kimenetelében szerepet játszó szabadgyökök eliminálásában a foszfatidilkolin (a sejtben domináns mennyiségben jelenlévő foszfolipid) bizonyos származékai, elektron akceptor molekulákként szerepet játszhatnak.
- A foszfatidilkolin (PC) származékok pozitív hatásai (gyulladáscsökkentő), régóta köztudott, de a hatásmechanizmus nem ismert.
- Az élő sejtekben folyamatosan zajlanak demetilációs folyamatok, és patológiás körülmények között ezek intenzitása szignifikánsan megnő.

- Számos vizsgálat igazolja, hogy az un. Lombardi vagy metil-deficiens étrend daganatos folyamatot indukálhat.
- A metán a légkörben legnagyobb mennyiségben előforduló redukált állapotú szerves molekula, és a metán jelentős szerepet játszik a hidroxil szabadgyök légkörből történő eltávolításában.

## **CÉLKITŰZÉSEK**

Vizsgálataink során célul tűztük ki az alábbiakat:

- bebizonyítani, hogy a tranzienst hipoxia metánképződést indukál aerob, élő rendszerekben;
- körvonalazni a mechanizmust, amely az emlős sejtekben és sejtorganellumokban metán képződéshez vezet, leírni a folyamatban résztvevő komponenseket;
- megvizsgálni az elektrofil metil csoportot hordozó kolin származékok esetleges oxigén szabadgyökfogyó kapacitását;
- tesztelni és összehasonlítani a foszfatidilkolin metabolitok metil donor (metánképző) potenciálját;
- demonstrálni a metán generációt szabadgyök-hatás alatt a mitokondriumban és sejttenyészeteken hipoxiás körülmények között;
- bizonyítani a lehetséges kapcsolatot az elektrofil metil csoportot hordozó foszfolipid származékok metán termelési kapacitása és szabadgyök scavenger kapacitása között;
- meghatározni a PC kezelés szerepét a gasztrointesztinális traktus ischemia-reperfúzió által kiváltott oxido-reduktív stressz-válaszában.

## **MÓDSZEREK**

### **Mitokondrium preparálás**

Schneider et al. (J. Biol. Chem. 176, 59, 1948) módosított módszerével 250 g/testsúlyú Wistar patkányok májából.

### **Oxigénfogyasztás**

Oxygraph (Hansatech Instruments Ltd., UK) készülékhez csatlakozó Clark-típusú oxigén elektróddal.

### **Gázkromatográfiás analízis**

Gázkromatográf (Carlo Erba), lángionizációs detektorral, Chrompack kapilláris oszloppal.

### **Kísérletek sejt kultúrákon**

Perifériás endotél sejteket frissen preparáltunk sertés aorta szegmentumból és tenyésztettünk 10% foetális borjúsavóval kiegészített Dulbecco's Modified Eagle Medium-ban Gryglewski *et al.* (Br. J. Pharmac. 87, 685, 1986) módosított módszere szerint. A kísérleteket 10 napos sejt kultúrákon végeztük.

### **Szabadgyök meghatározás**

*Lucigenin* –alapú kemilumineszcencia mérés: Packard Tri-Carb Model 2100 folyadékszintillációs számláló, „out-of-coincidencia” mód (Ferdinandy *et al.*).

*NADPH oxidase assay*: frissen preparált granulocitákon Guarnieri *et al.* (BBA 30, 135, 1987).

### **Protein meghatározás**

Lowry *et al.* (*J. Biol. Chem.* 1951).

### **Kémiai kísérletek**

Szintetikus PC származékok (etanolamin, monometiletanolamin, dimetiletanolamin, kolin, betain, szarkozin, dimetilglicin) jelenlétében a hidroxilgyök-specifikus Udenfriend reakcióban (aszorbinsav,  $\text{Fe}^{3+}$  / EDTA,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,) szabadgyököt generáltunk és gázkromatográffal történő detektálás során mértük a felszabaduló metán mennyiségét.

### **In vivo állatkísérletek**

Kísérleteinket Na-pentobarbitállal (30 mg/tskg iv.) altatott hím és nőstény, keverék kutyákon végeztük (átlagos testsúly:  $18 \pm 2$  kg). Az endotracheálisan intubált állatok bal oldali artéria és véna femoralisába kanülöket vezetünk vérnyomásmérés illetve infúzió adás (10 ml/tskg/h Ringer laktát) céljából. A jobb véna femoralison keresztül Swan-Ganz katétert vezetünk az artéria pulmonalisba. Medián laparotomiából feltártuk és kiproparáltuk az a. mesenterica superiort (AMS), amelyre Transonic ultrahangos áramlásmérő fejet helyeztünk a véráramlás mérése céljából. A terminális ileum szakaszát ellátó mesenterialis véna oldalágába kanült helyeztünk, ezen keresztül monitorizáltuk az adott szegmentum vénás nyomását, valamint vérmintákat vettünk. Ettől a helytől proximálisan TGS Tonomitor ballonos katétert vezetünk az ileum lumenébe az intramucosális pH meghatározására. A vékonybél proximális szakaszából biopsziákat vettünk.

### **Hemodinamikai mérések**

Komplex hemodinamikai monitorozást végeztünk, a nyomás és a véráramlás jeleket folyamatosan regisztráltuk és analizáltuk komputerezált hemodinamikai monitor segítségével (SPELL Haemosys; Experimetria Ltd., Budapest, Hungary).

### **Intramukozális pH mérések**

Szilasztik ballonos katétert (TGS Tonomitor, Tonometrics Inc., Worcester, Massachusetts, U.S.A.) vezetünk az ileum lumenébe. Az arteriális vérgázokat ill. az intramukozális  $\text{pCO}_2$ -t

vérgáz analízátorral (AVL, Graz, Austria) mértük. Az intramukozális pH-t (pHi) a módosított Henderson-Hasselbach formula felhasználásával számítottuk, 30-perces egyensúlyra megállapított korrekciós faktor figyelembevételével.

### **Intesztinális szuperoxid-tartalom (SOx)**

A mérés frissen homogenizált szövetmintából történt, „*lucigenin*–*alapú kemilumineszcencia*” méréssel (ld. fentebb, Ferdinandy et al.).

### **Szöveti mieloperoxidáz (MPO) aktivitás mérés**

Ileum biopsziából Kuebler *et al.* (1996) módszerével (UV-1601 spectrophotometer, Shimadzu, Japán).

### **A kilégzett metán koncentráció mérése**

A tracheát intubáltuk (mandzsettás endotracheális cső, Portex Tracheal Tube). Az állatokat a kísérlet alatt végig spontán lélegeztettük. A normoxiás ventiláció elégségességét ismételt vérgáz analízissel ellenőriztük, beleértve az artériális vérmintákból történő oxigén parciális nyomás mérést (AVL, Graz, Austria). Az endotracheális csövet egy „non-rebreathing” egyenirányító szelep rendszerhez csatlakoztattuk. (Ambu GmbH, Germany). A kilégzett levegőből történő mintavétel alatt a légzési rendszer kivezető nyílását egy gázbiztos flexibilis alumínium zacskóhoz csatlakoztattuk (Plastigas, Linde Gas, Cologne, Germany). 2500 ml kilégzett levegőt gyűjtöttünk, amiből 1 ml-es gázmintákat vettünk gázkromatográffal történő metán koncentráció meghatározás céljából (HRGC 5300 Megaserie, lángionizációs detektor, Chrompack kapilláris kolonna).

### **Kísérleti protokoll**

Az állatokat random módon soroltuk a kísérleti csoportokba. Az 1. és 2. csoport normál laboratóriumi tápot kapott a kísérlet előtt 1 héttig. A 3-as csoportba tartozó állatok speciális, 1% PC-t tartalmazó tápot kaptak (Ssniff Spezialdiäten GmbH, 59494 Soest, Germany) a kísérlet előtt 6 napig 50 g/kg/nap dózisban. Az 1. csoport (n=5) álműtött kontrollként szerepelt, a 2. (n=6) ill. 3. (n=6) csoportokba tartozó állatokon teljes vékonybél ischaemiát indukáltunk az AMS okklúziójával. Vékonybél szöveti biopsziát, perifériás vérmintát, valamint az állat kilégzett levegőjéből gázmintát vettünk az SMA okklúzió előtt és után, valamint a reperfüziós periódus kezdetén és végén.

### **Statisztikai analízis**

Az adatok analízisét a SigmaStat for Windows (Jandel Scientific, Erkrath, Germany) statisztikai szoftvercsomag segítségével végeztük. Az *in vitro* adatokat az átlag  $\pm$  standard deviációval (SD) fejeztük ki; az eltéréseket  $p < 0.05$  alatt tekintettük szignifikánsnak.

Az *in vivo* adatok analízisére a Friedman féle ismételt variancia analízist alkalmaztuk az egyes csoportokon belül. Az időtől függő eltérések meghatározása Dunn módszerrel történt. A

csoporthoz közti különbséget Kruskal –Wallis "one way" variancia analízissel határoztuk meg, a páronkénti többszörös összehasonlítás céljából a Dunn módszert alkalmaztuk. Ezekben az esetekben a medián értékeket és a 75. ill. 25. percentiliseket adtuk meg, és a  $p < 0.05$  értéket tekintettük szignifikánsnak.

## EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉSÜK

1. Kémiai kísérletben igazoltuk, hogy az elektrofil metil csoportot hordozó PC metabolitok, demetiláció során eltávolíthatják a patológiás folyamatokban felszabaduló hidroxil szabadgyököket. Igazoltuk, hogy a felszabaduló metán mennyisége arányos a molekulák gyökfogó kapacitásával. Magas metán koncentrációt mértünk a metil csoportot N atomon hordozó PC származékokból a hidroxil szabadgyököt generáló Udenfriend komponensek (hidrogén peroxid, aszkorbinsav és katalitikus vas ionok) jelenlétében, a változás nagysága: DMSO > kolin > dimetiletanolamin > metiletanolamin > ethanolamin volt. Ebben a rendszerben a metán képződéssel párhuzamosan CO<sub>2</sub> ill. CO felszabadulást detektáltunk az aszkorbát molekulából.
2. Kísérleteink azt bizonyították, hogy a kolin hidroxil szabadgyököt elimináló képessége ugyanolyan nagyságrendű, mint a jól ismert hidroxilgyök scavenger mannitol, a DMSO és a DMTU molekulák szabadgyökfogó kapacitása.
3. Az alkoholos végcsoporttal rendelkező metil csoportot nitrogén atomon hordozó PC metabolitok hatékonysága az oxigén eredetű szabadgyökök eliminációjában arányos a reakcióban keletkező metán mennyiségével és a molekulán jelenlévő metil csoportok számával.
4. Elsőként közöltünk metán felszabadulást patkány máj mitokondriumokból. Hidroxil szabadgyök hatására metánt generáltunk frissen preparált élő mitokondriumok jelenlétében. A legmagasabb metán produkció a matrix frakcióban (2.96 nmol/mg protein) volt megfigyelhető hidroxil szabadgyök jelenlétében, ennél kevesebb metánt mértünk az intermembrán frakcióban (0.197 nmol/mg protein), és nagyon kis mennyiség volt csak detektálható a membrán frakciókban, így a belső membránban (0.08 nmol/mg protein) valamint a mitokondrium külső membránjában (0.042 nmol/mg protein).
5. Primér tenyésztett perifériás endotél sejteken különböző módszerekkel hipoxiás állapotot létrehozva igazolni tudtuk a patológiás folyamat és a metán produkció közötti összefüggést. Szignifikáns metán képződést (0-20 nmol/mg protein) mértünk intakt, tenyésztett perifériás endotél sejteken glukóz megvonás, valamint metabolikus gátlás során. A legmagasabb metán generációt hidroxil szabadgyökök képződése után, valamint fluorid ill. cianid mérgezés és glukóz megvonás együttes hatása mellett észleltük. Hasonló hatás volt megfigyelhető DNP kezelés után.

Az előbbieknél lényegesen kevesebb metánt detektáltunk a glukóz megvonás egyedüli hatása következményeként.

6. Az *in vitro* és *in vivo* kísérleti adatokból levonhattuk azt a következtetést, hogy a metán képződés mechanizmusa az aerob sejtek átmeneti oxigén hiányos állapotával áll összefüggésben. A metán-generáló reakció az élő szervezetek reduktív stresszre adott válasza, mely védelmet nyújthat a szervezet redox egyensúlyának felborulásakor.

7. Aerob organizmusból metán képződést mindeztáig nem közöltek. Megállapítottuk, hogy az *in vivo* metán generáció leírható a szöveti ischémiára adott válaszként, a gasztrointesztinális traktusban kóros mennyiségben képződő szabadgyököt elimináló folyamat következményeként és indikátoraként.

8. Fokozott PC bevitellel a gasztrointesztinális traktus gyulladós folyamatai befolyásolhatók. Elektron donor és akceptor csoportot hordozó PC metabolitok képesek a patológias folyamatokban felszabaduló oxigén eredetű szabadgyökök eliminálására.

### **Köszönetnyilvánítás**

Ezúton szeretnék megemlékezni Petri Gábor professzorról, aki a Kísérletes Sebészeti Intézetbe hívott, aki kutatói pályám irányvonalát megadta és kijelölte, és mindvégig támogatott munkám során.

Szeretném megköszönni Nagy Sándor és Boros Mihály professzoroknak, a Sebészeti Kutató Intézet korábbi és jelenlegi vezetőjének hogy a kezdetektől segítették a munkámat.

Nagy hálával tartozom Boros professzornak, akitől a munkám során mindenfajta emberi és szakmai segítségét megkaptam, és aki ennek a dolgozatnak a megírására ösztönzött.

Különösen köszönöm Dr Ghyczy Miklósnak konstruktív és értékes szakmai tanácsait.

Köszönöm kollegáim valamint az asszisztencia segítségét a kísérletes munkában. Különösen köszönöm Patyik Gabriella és Fónagy Andrea precíz, gondos munkáját.

Szeretném kifejezni köszönetemet mindazoknak, akik bármilyen módon hozzájárultak ahhoz, hogy ez a dolgozat elkészülhessen.