

KUTATÁSI TERV

1. Bevezetés:

Metán inhaláció hatásának vizsgálata a mitokondriális kalcium homeosztázisra hipoxiában

Keringési és légzési elégtelenség következtében kialakuló szöveti hipoperfúzió és hipoxiás állapotok a klinikai gyakorlatban fellépő komoly és sokszor nehezen orvosolható problémák. Ezen kórállapotok kialakulhatnak egy területre lokalizáltan (pl. agyi hipoperfúzió, szívizom iszkémia), de érinthetik az egész szervezetet (pl. akut respirációs distressz szindróma); az egészen enyhe oxigénellátottság csökkenéstől a teljes anoxiáig. A szöveti oxigénellátottság csökkenése intracellulárisan mitokondriális diszfunkcióhoz, az elektron transzport lánc zavarához vezet. Az oxigénhiányos területek reperfundálása viszont kétélű fegyver: az inkompletté vált oxigén redukció az elektron transzport láncon reaktív oxigén gyökök felszabadulásához vezet. A mitokondriumok a citoplazmatikus kalcium homeosztáziában is jelentős szereppel bírnak mind fiziológiás, mind patológias körülmények között. A mitokondriális permeabilitási tranzíciós pórusok (mPTP) kalcium túltelődés vagy oxidatív stressz hatására kinyílnak és a belső membránt szabadon átjárhatóvá teszik minden 1500 Da-nál kisebb molekulára. ⁽¹⁾ Ezen folyamatok felelősek az iszkémia-reperfúziót követő sejthalál valamint a gyulladásos folyamatok elindításáért.

Intézetünkben folyó korábbi kutatások kimutatták a metán gáz gyulladáscsökkentő hatását ⁽²⁾, míg más kutatócsoportok az antioxidáns és antiapoptotikus hatását ⁽³⁾. Felmerül a kérdés, hogy a metán, kis apoláros, a membránokba könnyen bediffundáló molekula révén az oxidoreduktív stressz hatásokat a mitokondriumok membránjának stabilizálásával ezáltal a mitokondriális funkció megőrzésével éri-e el ⁽⁴⁾. Kutatásunkban meg szeretnénk vizsgálni, hogy egy olyan egyszerű módszerrel, mint a metán inhalációja, képesek vagyunk-e javítani szubcelluláris szinten a sejtfunkciókat az oxigén hiánnyal járó különböző kórállapotokban.

2. Célkitűzés: Célunk egy olyan hipoxiás vagy hipoxiás és metán tartalmú gázkeverékkel lélegeztetett rágcsálómodell létrehozása, melyen a mitokondriális funkciók és a kalcium mozgások dinamikája nyomon követhető és összehasonlítható. Ezáltal a metán mitokondriális funkcióra és kalcium anyagcseréjére kifejtett hatását vizsgálánk.

3. Kutatási terv feladat- és ütemterv:

I. szemeszter (2018. szeptember 01. - 2019. január 31.)

Kísérleteinket hím Sprague-Dawley patkányokon intraperitonealis indukciós ketamin-xylazin altatást követően végezzük. A műtéti instrumentálás után (arteria carotis és vena jugularis katéterek, tracheostomán trachea kanül behelyezése) volumen és frekvenciakontrollált lélegeztetést alkalmazunk 30 percen át szintetikus levegőkeverékkel (21% O₂, 79% N₂). Ezt követően az állatokat véletlenszerűen hat csoportba osztjuk: az első 3 csoport képviseli az

enyhe hipoxia modelljét. További lélegeztetésük 30 percig tart, szintetikus levegővel (kontroll), enyhe hipoxiás (18% O₂) illetve hipoxiás levegőt és metánt (2,2% CH₄) tartalmazó gázkeverékkel. A negyedik, ötödik, és hatodik csoport a súlyosabb hipoxiát prezentálja, további lélegeztetésük 60 percig tart szintetikus levegővel (kontroll), 16% O₂ ± 2,2% metánt is tartalmazó gázkeverékkel.

Eközben a vénás kanülön keresztül RingerFundin infúziót és ketamin-xylozinseduxen fenntartó altatót biztosítunk, az artériás kanülön keresztül folyamatos invazív vérnyomás és szívfrekvencia monitorizálás; valamint az alsó végtagon oxigén szaturáció mérés történik.

A kísérleteket követően az állatokból artériás és vénás vérgáz mérés, laktát mérés, valamint a gasztrointesztinális traktusból (máj, vékonybél) mintavétel történik.

A máj mintákból homogenizátumot, valamint mitokondriumokat izolálátumot készítünk a nagy felbontású respirometriás mérésekhez. A respirométer (OROBOROS Oxygraph-2k) két zárt kamrájában párhuzamosan Clark elektród méri a respirációs médiumban oldott oxigén mennyiségét, amelyből a számítógép szoftvere kiszámolja a mitokondriális oxigénfogyasztást. A kalcium mozgások detektálásához Calcium Green 5N fluoreszcens festéket használunk a respirométer amperometrikus csatornájához csatlakoztatott kék szenzorral. Az izolált mitokondriumokat szukcinát szubsztráttal energetizáljuk.

II. szemeszter (2019. február 01. – 2019. június 30.)

A támogatási időszak második félévében az első félévben ismertetett protokollok szerint folytatom az *in vivo* és *ex vivo* méréseket, valamint a statisztikai analízist hajtom végre. A kapott eredmények kiértékelését és interpretálását számítógépes szoftvereket (DatLab, Microsoft Office Excel, Microsoft Power Point, SigmaPlot) segítségével végezném. Ebben az időszakban az eredményeimből tudományos publikációt készítenék elő.

4. Kutatócsoport keretében megvalósult kutatás jellemzői:

A Sebészeti Műtéttani Intézetben számos kutatást folyt és folyik az exogén metán jótékony hatásairól ⁽²⁾, valamint az endogénen felszabaduló metán jelentőségéről ⁽⁵⁾. A kutatócsoportnak negyedik éve vagyok tagja, az elmúlt években a metán xantin-oxidoreduktáz (XOR) enzimre gyakorolt hatását vizsgáltam *in vitro* körülmények között. Ezen enzim az iszkémia-reperfúzió során képződő reaktív oxigén származékok (ROS) egyik legjelentősebb forrása, de hipoxiában nitrit- és nitrátredukáló képessége miatt a nitrogén-monoxid (NO) termelésben is szerepet játszik ⁽⁶⁾. Eredményeink szerint metán hatására megváltozik a XOR szubsztrátspecifitása, s így iszkémiában csökkenti a kóros mértékű NO termelődést, míg reperfúzió során a ROS termelését, ezáltal az oxidatív stressz mértéke csökken. Ezen kutatásom nyomán az intézet által a témában megjelent tudományos cikk társszerzője lettem⁽⁷⁾.

5. Vállalások (kötelező és nem kötelező):

Kötelező:

- Szegedi Tudományegyetem - Általános Orvostudományi Kar által szervezett Tudományos Diákköri Konferencián való részvétel (2018. ősz)
- Az Új Nemzeti Kiválósági Program által szervezett rendezvényen való részvétel

Nem kötelező:

- Az Országos és a Marosvásárhelyi Tudományos Diákköri Konferencián való részvétel (2019. tavasz)

6. Összegzés: Kutatásunk során a metán gáz antiinflammatorikus és antiapoptotikus hatásmechanizmusának felderítése révén szeretnénk a későbbi klinikumban történő bevezetését elősegíteni, valamint az eredményeinket hazai és/vagy nemzetközi folyóiratokban publikálni.

7. Fontosabb irodalomjegyzék:

- (1) Elustondo PA. et al. Spermine selectively inhibits high-conductance, but not low-conductance calcium-induced permeability transition pore. *Biochim Biophys Acta*. (2015) Feb Volume 1847, Issue 2, Pages:231-240.
- (2) Boros M. The anti-inflammatory effects of methane. *Critical Care Medicine* (2012) 40(4):1269–1278.
- (3) Li H, Wang YJ et al. Comments and hypotheses on the mechanism of methane against ischemia/reperfusion injury. *Med Gas Res*.(2017) Jun 30;7(2):120-123.
- (4) Mészáros AT et al. Mitochondria As Sources and Targets of Methane. *Frontiers in Medicine (Lausanne)*. (2017) Nov 13;4:195.
- (5) Tuboly E. et al. Determination of endogenous methane formation by photoacoustic spectroscopy. *J Breath Res*. (2013) Dec;7(4):046004.
- (6) Cantu-Medellin N. et al. Xanthine oxidoreductase-catalyzed reduction of nitrite to nitric oxide: insights regarding where, when and how. *Nitric Oxide*. (2013) Nov 1;34:19-26.
- (7) Poles MZ. Reduction of nitrosative stress by methane: Neuroprotection through xanthine oxidoreductase inhibition in a rat model of mesenteric ischemiareperfusion. *Free Radical Biology and Medicine* 120 (2018) 160–169

8. Témavezetői ajánlás¹: A pályázó 2014 óta végez tudományos diákköri és kutatómunkát a Sebészeti Műtéttani Intézetben, ahol a metán *in vitro* xantin-oxidoreduktáz enzimre gyakorolt hatásait vizsgálja. Eredményei alapján Nászai Anna pályázatának pozitív elbírálását messzemenően támogatom.

Kelt: Szeged, 2018 (év) május (hónap) 5. (nap)

.....
 Juhász László
 témavezető olvasható neve

.....
 Juhász László
 témavezető aláírása

.....
 NÁSZAI ANNA
 pályázó olvasható neve

.....
 Nászai Anna
 pályázó aláírása

¹ nem kötelező kitölteni