

SZAKMAI ZÁRÓJELENTÉS

Az OTKA F049515 sz. pályázathoz

„A glükóz és energiametabolizmus molekuláris szintű vizsgálata betegségmodelleken *in vivo* és *in situ*”

Témavezető: *dr. Berente Zoltán*,
PTE ÁOK Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet

BEVEZETÉS, CÉLKITŰZÉSEK ÉS AZOK SORSA

A pályázat öt évvel ezelőtt íródott, azzal a céllal, hogy „szeretnénk olyan, *in situ* és *in vivo* módszerekkel meghatározható, kvantitálható paramétereket találni, amelyek alkalmasak a kóros állapotok és az általuk okozott károsodások mértékének jellemzésére. Ezen keresztül nyílna lehetőség arra, hogy egyrészt a potenciális terapeutikumok (kezdetben a poli-ADP-ribóz-polimeráz <PARP>, később esetleg más kulcsenzimek gátlószerei) hatásosságára kapjunk számszerű információt, másrészt a károsodás és kivédése molekuláris mechanizmusának felderítéséhez kaphassunk támpontokat”. Ma már mindezt úgy fogalmaznám meg az azóta kiforrott új fogalmak használatával, hogy mágneses magrezonanciával nyerhető *biomarkereket* szerettünk volna találni. Ha ma készülné a pályázat, azt is hozzátenném, hogy a jelen vizsgálatok csak elő-biomarkerek (az FDA terminológia szerint „pre-biomarkerek” megkeresésére irányulnak) nem célozzák a biomarkerek továbbfejlesztését (ami pl. több centrumban végrehajtott összehasonlító vizsgálatokat is igényelne).

A pályázat öt évvel ezelőtti formájában kiemelten kezelte a metabolomikai-metabonomikai megközelítést, ami akkoriban nagyon perspektivikus ötletnek látszott, számos konferencián és szakmai fórumon „forró témaként” kezelték. A megközelítés magában hordozta a minimálisan invazív diagnosztikai alkalmazások ígérését, különösen azt követően, hogy egy a *Nature Medicine*-ben megjelent tanulmány szerint a vérplazma ¹H NMR-spektrumából metabolomikai eszközökkel megállapítható a szívkoszorúérbetegség jelenléte, sőt akár kiterjedése is,ⁱ tehát a diagnosztikához addig szükséges angiográfiás katéterezés kiváltható lenne egy vérvétellel. 2005 január 1-jén (a jelen pályázat kezdetével gyakorlatilag egyidejűleg) a Genome Canada 7,5 millió dollár befektetésével elindította a Human Metabolome Project-et.ⁱⁱ Ugyancsak jól illusztrálja a téma öt évvel ezelőtti kiemelkedő korszerűségét az a „magánéleti” esemény, hogy a jelen pályázat benyújtása előtt röviddel egy 19 résztvevős EU6 pályázatunk az informális indoklás szerint azért maradt le kettővel a rangsorban a támogatottságról, mert nem volt benne elég erős a metabolomikai vonal.

Időközben azonban a különböző ilyen irányú vizsgálatokba bevont esetszámok növekedésével világossá vált egyfelől az, hogy a metabolomikai alapú diagnosztika zavartűrése (robusztussága) az egyik legsebezhetőbb pontja; kiderült például a nevezetes szívkoszorúér-diagnosztikai eljárásról is, hogy a predikációs képessége mégsem olyan erős, mint elsőre látszott, sőt.ⁱⁱⁱ

Másfelől az is kiderült, hogy a Human Metabolome Database adattartalma is csak kritikával használható (pl. sok esetben életszerűtlen koncentrációban és/vagy életidegen oldószerekben vették fel egyes metabolitok spektrumait, ezért a kémiai eltolódások esetenként távol eshetnek az élettani folyadékokban mérhető értékektől).

Harmadrészt az is világossá vált, hogy az adatfeldolgozás és a statisztikai kiértékelés ugyancsak jelentősen képes befolyásolni az eredmények reprodukibilitását, ezért nagyon jelentős statisztikai és bioinformatikai arzenál és humán erőforrás is szükséges egy ilyen típusú projekt eredményes műveléséhez. Természetesen a szakirodalomban ma már található olyan dolgozatok (elsősorban a tématerület vezető laborjából – Imperial College London), amelyek adresszálják az adatgyűjtés^{iv} és az adatfeldolgozás buktatóit (lásd pl. a kémiai eltolódás kalibrációja biofolyadékokban^v), továbbá igyekeznek validált eljárásokat kialakítani,^{vi} de ezeket az eredményeket késői megjelenésük miatt a jelen pályázat keretei között már nem volt időnk/alkalmunk kipróbálni.

Összességében ma, 2009 legelején úgy látom, hogy az alapvető biofolyadékok, mint a vérszérum ill. plazma, a vizelet, a cerebroszpinális folyadék és az amnion metabolomikai NMR-analízise nagy erővel és változatos módszerekkel megindult ugyan a világban, és egy nagy közös adatbázis kialakulóban van, de a holisztikus, „tűt a szénakazalban” megközelítés *egyelőre* még nem eredményezett jól használható biomarkereket. A legrobustusabb eredmények olyan, toxikológiai jellegű projektekből születtek, amikor azt vizsgálták, hogy mi lesz egy kívülről bevitt, a szervezetben nem létező anyag sorsa az élő rendszerben. Ezen a ponton meg kell említeni, hogy magyar szerzőknek is sikerült már - a világ tématerületen vezetőnek számító laborjával együttműködésben – néhány hónapja egy metabonomikai NMR alkalmazást bemutató dolgozatot publikálniuk.^{vii}

A jelen pályázat nem büszkélkedhet sajnos szűken értelmezett metabolomikai témájú cikkekben leközlhető eredményekkel. Ennek véleményem szerint az az oka, hogy a projekt kezdetén még nem lehetett látni néhány olyan akadályt, amit végül nem is sikerült átugranunk. Ilyen például, hogy csak menet közben derült ki: a rendelkezésünkre álló térerősség mellett nyerhető spektrumok felbontása valószínűleg nem elégséges, még 2D mérések esetén sem. Azt is itt kell megemlíteni, hogy előre nem láthatóan sok időt voltunk kénytelenek szoftverfejlesztéssel és paraméterezéssel, valamint a többváltozós statisztikai analízis megtanulásával eltölteni. A mintákkal kapcsolatban minden modellben jellemző volt, hogy a metabolomikai vizsgálatra szánt minták közötti szórás (azaz az egyes metabolitok koncentrációjának imprecizitása) minden igyekezetünk ellenére nagyon magas maradt még a kezeletlen csoportokon belül is. Végül pedig azt is meg kell jegyezni, hogy most kellett megtanulnunk: a nemzetközi tudományos irodalom „farkastörvényei” szerint a szárnypróbálgatások és a kezdeti buktatók által felemésztett idő a külvilág szemében mindaddig „hiábavalónak mutatkozik”, amíg publikálható minőségű eredmény nem születik – ebben a helyzetben van pillanatnyilag a megpályázott projekt ezen része is.

A metabolomikai publikációk nélkül maradásnak van még egy – némileg személyes – oka. Bár a pályázat benyújtásához szükséges rektori aláírás alkalmával Prof Kosztolányi György akadémikus, akkori rektorhelyettes méltatta azt a ambíciómat, hogy előzmények nélküli, „ugrás a sötétbe” típusú projekttel pályázom, és nyugtatott, hogy „nem baj, ha nem lesz belőle szabadalom, terápiás alkalmazás, horribile dictu még cikkek sem”, de utólag visszatekintve úgy látom: Magyarországon szocializálódott tudományos munkásként, viszonylag sikeres és termékeny előélettel, viszonylag jelentős túljelentkezés mellett elnyerve a pályázatot az első másfél-két év után akkorára nőtt bennem a lelkiismeretfurdalás amiatt, hogy nem láttam, miből és mikor lesz már nemzetközi publikáció, hogy a mindennapi munka apró döntéseit gyorsabb eredménnyel kecsegtető irányba próbáltam terelni.

Végeredményben az eredeti projektet a metabolomikára nem leszűkítve, tehát betegségmodellekben történő, MR-módszerekkel detektálható (pre-)biomarker-keresés terén végül sikerült közölhető eredményeket elérnünk, amit az alábbiakban ismertetek.

MÓDSZEREK

In vitro és ex vivo vizsgálatok

Amikor a minta vérszérum vagy szövetextraktum volt, azokat az *in situ* vagy *in vivo*-vizsgálatok után feláldozott állatokból nyertük; a vérmintákból centrifugálással választottuk el a sejtes elemeket és a felülúszót használtuk, a szövetextraktumokat a kivágás után legrövidebb időn belüli cseppfolyós nitrogénbe fagyasztást és porítást követő perklórsavas fehérjementesítő feltárással készítettük

Ezekben az esetekben a minta vizes oldatként állt elő, így hagyományos oldat NMR-módszerekkel vizsgáltuk: a vérszérumokat (tipikusan ~100 µl) 5 v/v% D₂O-val hígítva 5 mm átmérőjű Shigemi-csővekben tettük a mágnesbe, a szövetextraktumokat (tipikusan ~500 µl) D₂O-t tartalmazó inzertcsővel ellátott hagyományos NMR-csővekben mértük.

1D ¹H és 2D ¹H-¹³C gHSQC (továbbá esetenként ¹H-¹H COSY) méréseket hajtottunk végre, a kapott spektrumokat alapvonalkorrekció után egyenlő hosszúságú szakaszokra szeleteltük, az egyes szeletekhez tartozó numerikus integrálokat táblázatba vittük és többváltozós analízissel próbáltunk olyan paramétereket találni, amelyek értékei kellően jellemzők voltak arra, hogy a minták „kontroll” vagy „beteg” csoportba tartoznak.

In situ vizsgálatok

Amikor a minta izolált szerv, azaz Langendorff szerint perfundált patkányszív volt, olyankor a patkányból kiemelt szívet a házi építésű retrográd perfúziós apparátussal tartottuk működésben, és a szívet a berendezéshez tartozó, 20 mm külső átmérőjű, keringetett perfúziós folyadékot tartalmazó csőben helyeztük a mágnesbe és arról *in situ* ³¹P NMR-spektrumokat vettünk fel 3 perces időfelbontással.

A szív tápanyagellátását (a perfúziós folyadék átfolyását) elzárva ischaemiát, újra megnyitva reperfúziót idéztünk elő. Az ischaemia alatt a perfúziós folyadékot szükség esetén kicserélhettük. A spektrumokból megállapítottuk az ATP, a kreatin-foszfát és a szervetlen foszfát relatív koncentrációját. 2-dezoxi-glükózt adva a perfúziós folyadékhoz a 2-dezoxi-glükóz-6-foszfát koncentrációjának változásán keresztül következtethettünk a glükózfelvétel sebességére is.

Egyes szíveket [1-¹³C]glükózt tartalmazó oldattal perfundáltunk, ezeket a perfúzió végén cseppfolyós nitrogénben lefagyasztottuk, majd szövetextraktumot készítettünk belőlük.

In vivo vizsgálatok

Amikor a minta intakt egér volt, olyankor az intraperitoneális ketamininjekcióval altatott állatot a mintatartóba rögzítettük és úgy helyeztük a képalkotó mérőfejbe. Shimelés és RF-kalibráció után egy durva lokalizációs képalkotó mérés alapján kiválasztottuk az állat vizsgálandó részét és kijelöltük a mérendő szeleteket. Ezután több különböző időzítés (ezzel T₁, T₂, spinsűrűség és diffúzió szerint különböző súlyozás) mellett számos képsorozatot készítettünk a vizsgálandó területekről, míg olyan paramétersort nem találtunk, amelyben a legnagyobb kontrasztot mutatják a kontroll és a beteg csoport közötti elváltozások. Ezek megállapítása után rögzítettük az összes állat keresztmetszeti képeit a megfelelő paraméterek mellett.

EREDMÉNYEK AZ EGYES BETEGSÉGMODELLEKBEN

Glükózfelvétel posztischaemiás szívben

Irodalomból ismert, hogy ischaemia esetén a szív glükózfelvétele megemelkedik. Ezt mi is ki tudtuk mutatni Langendorff szerint perfundált patkányszíven *in situ* ^{31}P NMR-spektroszkópián. Mivel ismert, hogy a PARP-gátlók hatékonyan segítik a posztischaemiás szívben az energiametabolizmus normális állapot felé való visszatérését, a molekuláris hatásmechanizmus felderítésének részeként vizsgáltuk azt, hogy egyes PARP-gátlók hogyan módosítják a szív glükózfelvételét, ha egyáltalán.

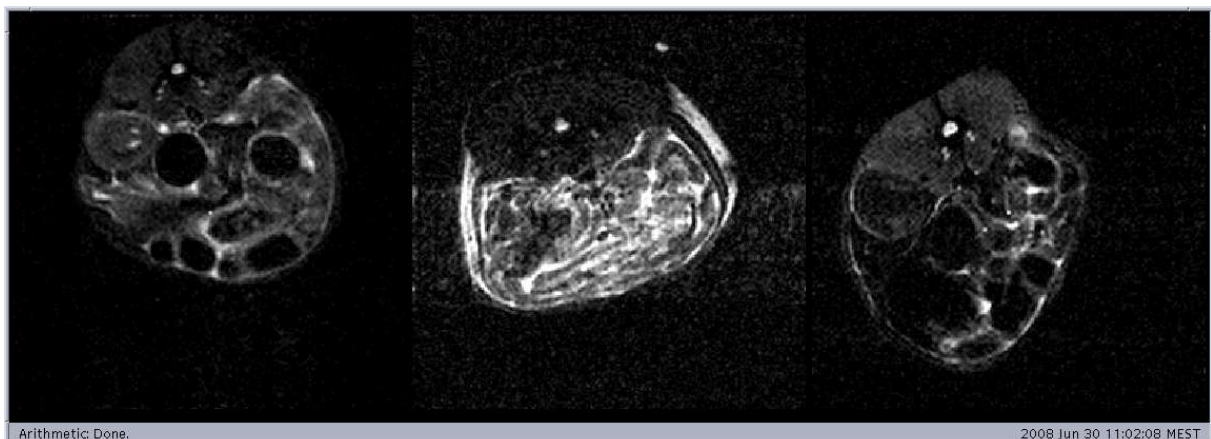
Azt találtuk, hogy az általunk ismert és korábban más területeken már jellemzett PARP-gátlók többsége csökkenti a glükózfelvétel sebességét, míg egyikük szignifikánsan tovább növeli azt. A kapcsolódó jelátviteli útvonalak vizsgálata még folyamatban van, az előzetes eredmények az Akt és az AMPK involválódását mutatják.

Ezen eredményeinkből kéziratot postázunk a legközelebbi jövőben.

Ugyanezen modellen vizsgáltuk a glükóz sorsát [$1\text{-}^{13}\text{C}$]glükóz adása után szövetextraktumokból 2D $^1\text{H}\text{-}^{13}\text{C}$ gHSQC alapú metabolomikai vizsgálódással, azonban adataink irreproducibilitása nem engedte meg robusztus következtetés levonását.

Ferulaldehid szerepe a bakteriális lipopoliszachariddal keltett szepszis modellben

Kimutattuk, hogy T_2 -súlyozott MR képeken a szepszist kísérő gyulladás jól vizualizálható a hasüregben, és az alkalmazott gyógyszerjelölt (jelen esetben: ferulaldehid) terápiás hatékonysága jól követhető. Az alábbi ábrán látható egy kontroll állat (balra), egy LPS-kezelt állat (középen) és egy LPS+ferulaldehid kezelést kapott állat hasüregének keresztmetszeti T_2 -súlyozott képe.

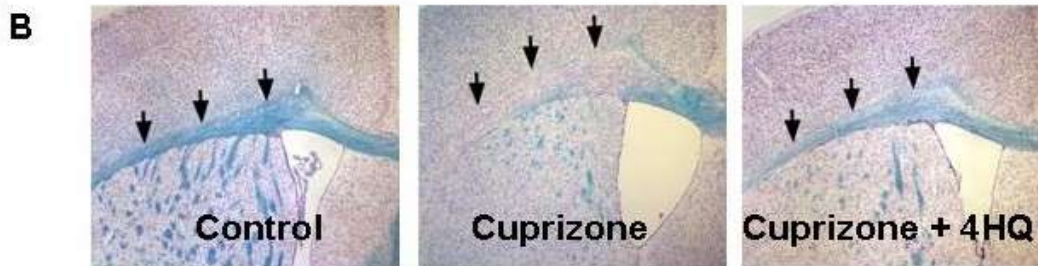
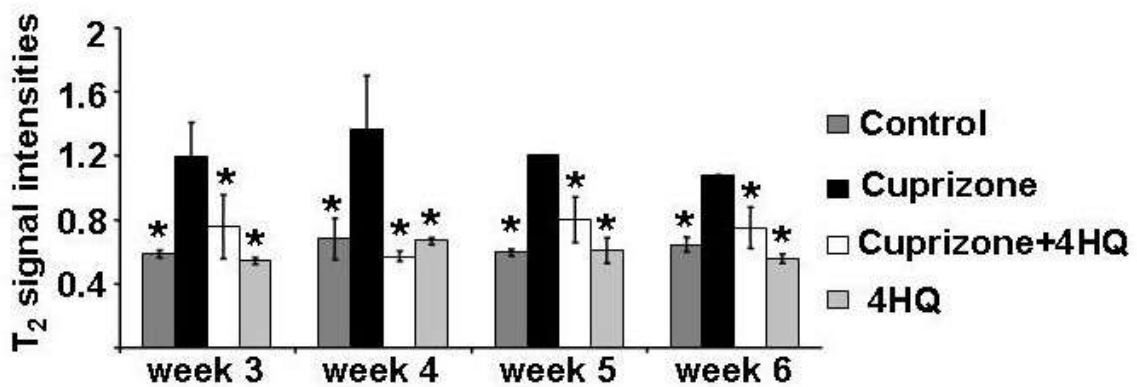
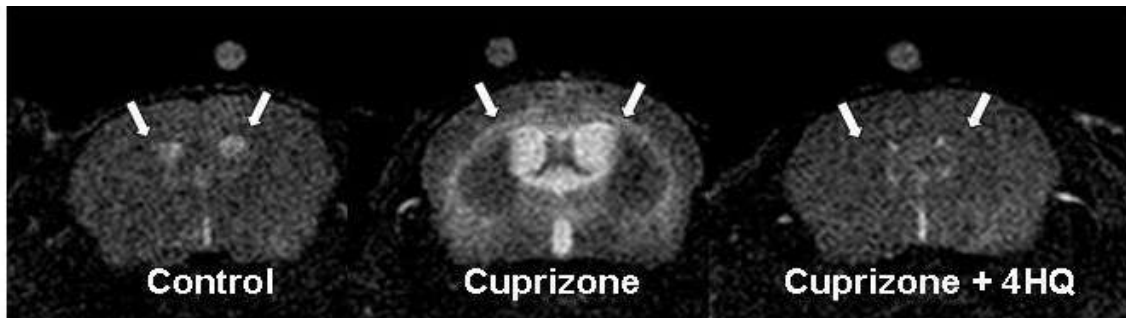


Ezen modellben elért eredményeinkről már beszámoltunk egy közleményben (J. Nutrition, Epub 2008)

Ugyanezen modellen vizsgáltuk az egerek vérszérumait 1D ^1H NMR és 2D $^1\text{H}\text{-}^{13}\text{C}$ gHSQC alapú metabolomikai vizsgálódással, azonban adataink irreproducibilitása nem engedte meg robusztus következtetés levonását.

SM

A sclerosis multiplex cuprizonnal keltett modelljében T₂-súlyozott MRI segítségével jól vizualizálható elváltozások történnek a corpus callosumban, amelyek vizsgálataink alapján jól korrelálva követik a demyelinizáció mértékét (amit feláldozás után Luxol festéssel igazoltunk), és ugyanakkor a terápiás hatékonyságot is (lásd az alábbi ábrán; 4HQ = 4-hidroxi-kinazolin).



Ezen modellben hormonkeverékkel elért terápiás eredményeinkről már beszámoltunk egy közleményben (Glia, Epub 2008), a PARP-gátlóval kapcsolatos vizsgálatainkból pedig benyújtottunk egy kéziratot.

ÖSSZEFOGLALÁS

Tanulmányoztuk a glükóz- és energiametabolizmus időbeli alakulását valamint a fellépő élettani-morfológiai változásokat több betegségmodellben, elsősorban in situ és in vivo NMR-spektroszkópiai és MR mikroképképző (MRI) módszerekkel. Megkíséreltük az elváltozások mértékét MR-módszerekkel meghatározható paramétereken keresztül jellemezni, és így kísérleti terapeutikumok (elsősorban poli(ADP-ribóz) polimeráz gátlók) hatásosságát jellemezni. Szövetextraktumokból végzett in vitro NMR-vizsgálataink (egészükben, a mintavételt és a mintaelőkészítést valamint az adatfeldolgozást is beleértve) sajnos nem bizonyultak eléggé robusztusnak ahhoz, hogy publikálható következtetéseket vonjunk le az adatokból.

Főbb eredményeink:

- A szív glükózfelvételének ischaemia-reperfúzió után tapasztalt megemelkedésének mértékét egyes PARP-gátlók fokozzák, mások mérséklék Langendorff szerint perfundált izolált patkányszívben. A glükózfelvétel sebességének emelkedéséért kísérleteink alapján több jelátviteli útvonal is felelős, a vizsgált útvonalak közül az Akt és az AMPK szerepe látszik legjelentősebbnek.
- Bakteriális lipopoliszachariddal indukált szepikus sokktól szenvedő egerekben a gyulladáshoz kapcsolódó területek T2-súlyozott MR-képeken való hiperintenzív ábrázolódását kísérleti terapeutikumokkal folytatott kezelések hatásosságának monitorozására használtuk.
- A sclerosis multiplex cuprizone-kezeléssel keltett egérmodelljében erős korrelációt találtunk a demyelinizáció és a corpus callosum T2-súlyozott MR-képeken mutatott hiperintenzív ábrázolódása között. Ez alapján több kísérleti terápiás eljárást teszteltünk, melyek közül kettő (egyik szteroidkeveréssel, a másik egy PARP-gátlóval) különösen eredményesen szorította vissza a demyelinizációt.

Eredményeinkről mintegy tucatnyi konferenciamegjelenés (előadások, poszterek) mellett két nemzetközi közleményben, két benyújtott és egy előkészületben lévő kéziratban számoltunk be, a már megjelent publikációk összesített impaktfaktora: 9,15.

IRODALOMJEGYZÉK

ⁱ Brindle JT, Antti H, Holmes E, Tranter G, Nicholson JK, Bethell HW, Clarke S, Schofield PM, McKilligin E, Mosedale DE, Grainger DJ.:

Rapid and noninvasive diagnosis of the presence and severity of coronary heart disease using ¹H-NMR-based metabolomics.

Nat Med. 2002 Dec;8(12):1439-44.

ⁱⁱ <http://www.metabolomics.ca>

ⁱⁱⁱ Kirschenlohr HL, Griffin JL, Clarke SC, Rhydwen R, Grace AA, Schofield PM, Brindle KM, Metcalfe JC.: Proton NMR analysis of plasma is a weak predictor of coronary artery disease.

Nat Med. 2006 Jun;12(6):705-10.

^{iv} Maher AD, Crockford D, Toft H, Malmodin D, Faber JH, McCarthy MI, Barrett A, Allen M, Walker M, Holmes E, Lindon JC, Nicholson JK.:

Optimization of human plasma ¹H NMR spectroscopic data processing for high-throughput metabolic phenotyping studies and detection of insulin resistance related to type 2 diabetes.

Anal Chem. 2008 Oct 1;80(19):7354-62.

^v Pearce JT, Athersuch TJ, Ebbels TM, Lindon JC, Nicholson JK, Keun HC.:

Robust algorithms for automated chemical shift calibration of 1D ¹H NMR spectra of blood serum.

Anal Chem. 2008 Sep 15;80(18):7158-62.

^{vi} Barton RH, Nicholson JK, Elliott P, Holmes E.:

High-throughput ¹H NMR-based metabolic analysis of human serum and urine for large-scale epidemiological studies: validation study.

Int J Epidemiol. 2008 Apr;37 Suppl 1:i31-40.

^{vii} Bohus E, Coen M, Keun HC, Ebbels TM, Beckonert O, Lindon JC, Holmes E, Noszál B, Nicholson JK.:

Temporal metabolomic modeling of l-arginine-induced exocrine pancreatitis.

J Proteome Res. 2008 Oct;7(10):4435-45.