

**PH.D. ÉRTEKEZÉS**

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

**JANCSÓ ZSANETT**

TÉMAVEZETŐ:

**DR. HERMESZ EDIT**  
EGYETEM DOCENS

BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA  
SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM  
TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS INFORMATIKAI KAR  
BIOKÉMIAI ÉS MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI TANSZÉK

**SZEGED**

**2015**

## TARTALOMJEGYZÉK

I. BEVEZETÉS.....	4
II. IRODALMI ÁTTEKINTÉS .....	6
1. A szabadgyök kutatás története.....	6
2. Szabadgyökök és reaktív oxigén intermedierek.....	6
3. Antioxidáns védelmi rendszer.....	9
A szuperoxid-dizmutáz (SOD).....	11
A kataláz (KAT).....	12
A glutation (GSH) és a GSH redox rendszer .....	12
Metallothioneinek (MT).....	13
Hemoxigenázok (HO).....	14
4. Oxidatív stressz.....	17
A nehézfémek és az oxidatív stressz.....	18
A cukorbetegség és az oxidatív stressz.....	21
III. CÉLKITŰZÉS .....	26
IV. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	28
1. Kísérleti állatok és kezelési körülmények.....	28
Pontyok nehézfém-kezelése .....	28
Krónikus diabéteszes patkánymodell előállítása.....	28
2. Molekuláris biológiai vizsgálati módszerek.....	29
RNS preparálás fagyasztott mintákból.....	29
Reverz transzkripció (RT) és polimeráz láncreakció (PCR).....	30
Primerek .....	31
Géldokumentáció, denzitometráls .....	31
Filogenetikai analízis .....	32
3. Biokémiai mérési módszerek .....	33
Fehérjék kvantitatív meghatározása .....	33
A GSH koncentráció meghatározása .....	33
A GSSG koncentráció meghatározása .....	34
A LP mérése.....	34
A H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> koncentráció meghatározása.....	35
A ONOO <sup>-</sup> koncentráció meghatározása .....	35
SOD aktivitás meghatározása .....	35
KAT aktivitás meghatározása .....	36
A szövetek nehézfém-tartalmának meghatározása .....	36
4. Hisztológiai vizsgálati módszerek.....	36
Bélminták előkészítése transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz .....	36
Posztembedding immunhisztokémiai vizsgálatok .....	37
5. Statisztikai analízis.....	38

V. EREDMÉNYEK .....	39
A. Nehézfém expozíció hatása két hemoxigenáz gén és egyéb antioxidáns markerek kifejeződésére pontyban.....	39
1. A ponty <i>ho</i> gének azonosítása.....	39
2. A hemoxigenázok filogenetikai analízise .....	41
3. A <i>ho</i> gének alap expressziója.....	42
4. Nehézfém expozíció hatása a <i>ho</i> gének kifejeződésére .....	43
A Cd-kezelés hatása .....	43
Az As-kezelés hatása.....	45
5. Fém felhalmozódás májban és vesében .....	46
6. A máj és a vese GSH és GSSG tartalma és LP-ja.....	46
7. Fém-indukálta változások SOD és KAT aktivitásában, valamint a H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> koncentrációban .....	47
B. Az oxidatív stressz markerek és a szöveti károsodások vizsgálata streptozotocin-indukálta diabéteszes patkányok különböző bélszakaszaiban .....	48
1. Diabétesz indukálása a kísérleti állatokban.....	48
2. A diabétesz okozta károsodások .....	48
A diabétesz hatása a pro- és anti-apoptotikus markerekre .....	49
A nekrosis jelei vastagbélben.....	51
3. A bélszakaszok ONOO <sup>-</sup> koncentrációja a diabétesz kialakulását követő 10. héten.....	52
4. Az antioxidáns védelmi rendszer .....	52
A SOD és KAT aktivitása különböző bélszakaszokban .....	52
A GSH homeosztázis alakulása különböző bélszakaszokban.....	53
A <i>mt</i> expressziós mintázata különböző bélszakaszokban .....	54
A <i>ho</i> expressziós mintázata különböző bélszakaszokban .....	54
VI. MEGBESZÉLÉS .....	56
A. Akut arzén és kadmium expozíció hatása két hemoxigenáz gén és egyéb antioxidáns markerek kifejeződésére pontyban.....	56
B. Az oxidatív stressz markerek és a szöveti károsodások vizsgálata streptozotocin-indukálta diabéteszes patkányok különböző bélszakaszaiban .....	61
ÖSSZEFOGLALÁS .....	67
SUMMARY .....	71
IRODALOMJEGYZÉK .....	75
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS .....	86

## I. BEVEZETÉS

A szabadgyök kutatás napjainkban a tudományos érdeklődés középpontjában áll. Széleskörű vizsgálata különböző modellrendszerekben elengedhetetlenül fontos annak érdekében, hogy a patológiás folyamatokban bekövetkező változások mechanizmusát, összefüggéseit feltérképezzük.

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 következtében a sejtek membránjai is. Súlyos esetben a sejt alapvető életfunkciói oly mértékben sérülhetnek, hogy apoptózis vagy nekrozis következik be.

Kísérleteink során kétféle modellrendszerben vizsgáltuk a szabadgyök képződést, az antioxidáns védekező rendszer működését és az oxidatív stressz következtében kialakuló károsodásokat. Aktuálisan felmerülő környezeti és népegészségügyi problémákra tekintettel választottuk ki a modelleket.

A környezetünk, ezáltal vizeink nehézfém szennyezettsége napjainkban is komoly problémát jelent, a világ számos táján okoz egészség károsodást. A vízi élőlények közül a halak, melyek a tápláléklánc csúcsán foglalnak helyet, fokozott veszélynek vannak kitéve azáltal, hogy a táplálékukban felhalmozódott mérgező anyagok akkumulálódnak a szervezetükben, valamint kopoltyújukon és bőrükön keresztül is állandóan ki vannak téve a vízben oldott káros anyagoknak. Kiváló modellorganizmusok a környezeti stresszhatás tanulmányozására. Munkacsoportunk számos kísérlete során használta a pontyot modellállatként, amelybe számos, a stresszválaszban szerepet játszó fehérjét, illetve az azokat kódoló géneket azonosított és jellemzett. Jelen kísérletben az antioxidáns védekezésben fontos szerepet játszó, ez idáig pontyban még nem azonosított hemoxigenázokat kódoló gének kifejeződését tanulmányoztuk fiziológias körülmények között és nehézfém (kadmium, arzén) expozíciót követően. Összefüggést kerestünk a nehézfém felhalmozódás, az oxidatív stressz, a makromolekula károsodás és a *ho* gének expressziója között.

Munkánk másik részében a hiperglikémia során bekövetkezett változásokat követtük nyomon streptozotocin-indukálta diabéteszes patkányokban. A cukorbetegség (*diabetes mellitus*) napjainkban fontos egészségügyi problémát jelent, különös tekintettel a fejlett országokra. Az Egészségügyi Világszervezet szerint 2000-ben összesen 171 millió embert érintett ez a betegség a világon, ami a Föld népességének 2,8%-a, a betegek száma várhatóan 366 millióra fog növekedni 2030-ra [221]. A cukorbetegség többségénél gyakran jelentkeznek különböző gasztrointesztinális panaszok, úgymint reflux, korai jóllakottság érzet, a gyomor ürülésének késése, hányás, székrekedés vagy hasmenés. Korábbi kísérleteink szerint a diabéteszes patkányok különböző bélszakaszaiban megfigyelt patológias változások a colon-ileum-duodenum tengely mentén fokozatosan, grádiens-szerűen alakulnak ki [27]. Molekuláris vizsgálatok eredményei szegment-specifikus szabályozási mechanizmusokat feltételeznek, amelyek a megfigyelt, bélszakasztól függő patológias változásokért felelősek [27, 87]. Ezen eredmények alapján azt a két bélszakaszt (duodenum, colon) választottuk a vizsgálatainkhoz, melyekben megfigyelt változások között a legnagyobb volt a különbség. Az utóbbi évtizedekben közzétett számos kísérleti eredmény utal arra, hogy a szénhidrát-anyagcsere zavara során oxidatív stressz alakul ki. Kísérletünkben a diabétesz hatására bekövetkező fokozott szabadgyök képződés, az antioxidáns védekezés aktiválódása, valamint az oxidatív stressz okozta károsodás régió-specifikus változásaira összpontosítottunk.

## II. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 1. A szabadgyök kutatás története

A szabadgyök kifejezést a 20. század eleje óta használják a szerves és szervetlen kémiában reakcióképes vegyületekre. A gyököknek jelentős szerepet tulajdonítottak a sejtben lejátszódó káros folyamatokért [68]. Gerschman 1954-ben közzétette szabadgyök elméletét, amely kimondja, hogy az oxigén mérgező tulajdonsága annak részlegesen redukált formáiból ered [66]. Az oxigén toxikus hatásának lehetőségét Harman hipotézise tovább erősítette. Véleménye szerint a molekuláris oxigénből enzimatis reakciók káros melléktermékeként keletkező aktív gyökök károsítják a sejteket [80].

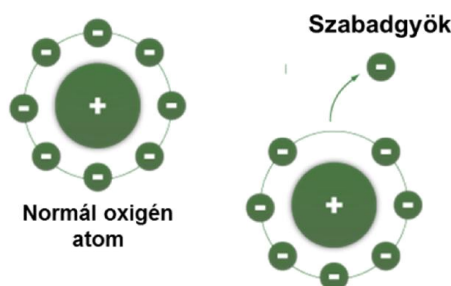
A szabadgyök kutatás újabb korszaka azzal a felfedezéssel kezdődött, amelyet McCord és Fridovich tett 1969-ben. Megállapították, hogy a szuperoxid-dizmutáz (SOD) enzim szerepet játszik a szuperoxid gyök ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) semlegesítésében és jelen van szinte minden aerob sejtben [133]. Ez a felfedezés végül meggyőzte a legtöbb kollégát arról, hogy a szabadgyökök fontos szerepet töltenek be a biológiában. Ezután számos kutató vizsgálta a gyökök által okozott oxidatív károsodást a DNS-en, fehérjéken, lipideken és egyéb sejtalkotókon [76].

Folytak olyan típusú kísérletek is, melyek a szabadgyökök funkcióját vizsgálták. Ezek eredményei bizonyították a szabadgyökök biológiai folyamatokban betöltött hasznos szerepét. Fény derült arra, hogy a  $\bullet\text{O}_2^-$  származéka, a hidroxil gyök ( $\bullet\text{OH}$ ) serkenti a guanilát cikláz aktivitását, amely a másodlagos hírvivő ciklikus guanozin-monofoszfát (cGMP) szintéziséért felelős [139]. A nitrogén-monoxiddal (NO) való kísérletek pedig további távlatokat nyitottak a szabadgyök kutatásokhoz.

### 2. Szabadgyökök és reaktív oxigén intermedierek

Szabadgyöknek nevezzük azokat az atom vagy molekula származékokat, melyek egy vagy több párosítatlan elektront tartalmaznak külső molekulapályájukon, és képesek hosszabb-rövidebb ideig önállóan is létezni. A párosítatlan elektron megváltoztatja az atom vagy molekula kémiai reaktivitását [74]. Az oxigén redukálásával vagy gerjesztésével létrejövő reaktív köztitermékek nem mindegyike szabadgyök, de szintén nagyfokú reaktivitással rendelkeznek. A nem gyökös termékeket

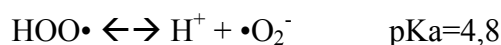
a gyökökkel együtt összefoglaló néven reaktív oxigén intermediereknek (*Reactive Oxygen Species*: ROS) nevezzük.



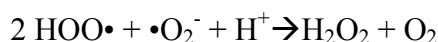
**1. ábra.** Szabadgyök képződése oxigén atomból egy elektron elvesztése során. (kép forrása: <http://replere.com/brochure/>)

Habár a reaktív köztitermékek a köztudatban káros molekulaként vannak jelen, jelenlétük az élő rendszerekben természetes és szükséges. Fontos szerepet játszanak a homeosztázis fenntartásában, hírvivőként különböző jelátviteli mechanizmusokban, továbbá különböző szabályozó funkciókat is betölthetnek. Számos szabadgyök termelő folyamat ismert az emlősökben.

A molekuláris oxigén egyelektronos redukciója során, kémiai, fizikokémiai és enzimatis uton is keletkezhet  $\bullet\text{O}_2^-$ . Legnagyobb mennyiségben a mitochondriális elektrontranszportláncban és az endoplazmatikus retikulumban termelődik [65]. A mikroszómális kevert funkciójú monooxidázok (pl. flavin-dehidrogenázok, xantin-oxidáz) működése során szintén képződik [47], csakúgy, mint a „*respiratory burst*” során. E folyamatban az immunrendszer polimorfonukleáris leukocitái (fagociták, monociták, makrofágok) a kórokozókkal szemben fokozott  $\bullet\text{O}_2^-$  termeléssel védekeznek a NADPH-oxidáz és mieloperoxidáz enzimek segítségével [16]. A  $\bullet\text{O}_2^-$  sav-bázis egyensúlyt alkot protonált formájával, a hidroperoxil gyökkel ( $\text{HOO}\bullet$ ), amely lipofil tulajdonsága révén könnyebben behatol a membránok lipid kettősrétegébe, és így képes a káros lipidperoxidáció előidézésére.



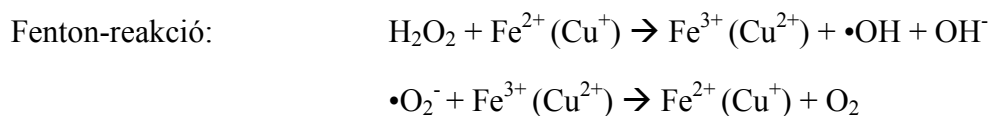
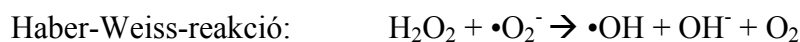
A  $\bullet\text{O}_2^-$  vizes közegben hidrogén-peroxiddá ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) és vízzé alakul spontán dizmutáció útján, vagy a SOD által katalizált folyamatban [76].



Számos enzim közvetlenül is termel  $\text{H}_2\text{O}_2$ -ot, mint pl. a monoamin oxidáz, vagy a galaktóz oxidáz, de a mitochondrium, a mikroszómák és a fagocitáló sejtek is termelik. A  $\text{H}_2\text{O}_2$ -nak nincs párosítatlan elektronja, így nem minősül gyöknek. Viszonylag stabil molekula, biológia rendszerekben hosszú lehet a féléletideje. Szabadon átdiffundál a biológiai membránokon, aminek következtében a termelődés helyétől távolabbra is képes eljutni [222].

A  $\text{H}_2\text{O}_2$  a Haber-Weiss-reakció során [63] a  $\bullet\text{O}_2^-$  által redukálódik. A  $\text{H}_2\text{O}_2$  viszonylag gyenge peroxo-kötésének felhasadása során egy  $\bullet\text{OH}$  és egy hidroxil ion ( $\text{OH}^-$ ) keletkezik. A  $\bullet\text{OH}$  a szervezet számára a legagresszívabb gyök. Citotoxicitása jelentősebb, mint a  $\bullet\text{O}_2^-$ -é. Jelentős reakcióképességének következtében gyakorlatilag már a keletkezési helyén és pillanatában elreagál [76], ezáltal minden közelében lévő molekulát képes oxidálni, láncreakciót indítani. A  $\bullet\text{OH}$  keletkezhet Fenton-típusú folyamat során is [64]. A Fenton-reakció egy elektron felvételével járó fémkatalizált folyamat, melyben az elektront redox-aktív fémek (Fe, Cu, Cr) szolgáltatják. Az oxidált fémionok redukáló formájukat a  $\bullet\text{O}_2^-$ -dal való reakció útján visszanyerik. A reakcióhoz szükséges fémionok a szervezetben szabad állapotban ritkán fordulnak elő, főként szállító és raktározó fehérjékhez kötve vannak jelen. Stressz hatására azonban a fémet kötő fehérjék is károsodhatnak, a fémionok ezáltal felszabadulhatnak, teret adva a gyökös reakciónak.

A biomolekulákkal történő reakciója eredményeként kevésbé reaktív szerves szabadgyök molekulák keletkeznek, melyek a képződés helyétől távolabb is kifejthetik károsító hatásukat. Oxigénnel reagálva szerves peroxidgyökké alakulnak, melyek újabb szerves vegyületekkel képeznek szerves szabadgyököt és szerves peroxidot. Ennek következtében a ROS mennyisége fokozódik, láncreakció indul be. A  $\bullet\text{OH}$ -t a keletkezése helyén jelenlévő tiol-vegyületek képesek hatástalanítani egy hidrogén átadásával. Ezen kívül a szervezet úgy védekezik ellene, hogy a képződését próbálja meggátolni [211].

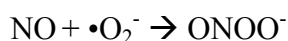




A  $\bullet\text{O}_2^-$  spontán reakcióban képes a NO-dal is reagálni. A NO is a kevésbé reaktív gyökök közé tartozik. Biológiai életideje viszonylag hosszú, a szervezetben másodlagos hírvivőként is szolgál. A NO-ot egy specializált enzimes család, a nitrogén-monoxid szintáz (NOS) termeli. A NO az endotél sejtekben és a neuronokban a konstitutív nitrogén-monoxid szintázok (eNOS és nNOS) által termelődik. Kis mennyiségben sejtvédő, sejtreguláló tulajdonsággal bír. Az indukálható nitrogén-monoxid szintáz (iNOS) nagy koncentrációban termeli a NO-ot, ami citotoxikus hatást fejt ki a mitochondriális enzimek és a légzési lánc bénítása révén. Szokás ezt „nitrozatív” stressznek is nevezni. Ha a NOS enzim kofaktorai, az L-arginin, amely citrullinná alakul és a tetrahydrobiopterin (THB<sub>4</sub>) nem állnak megfelelő mennyiségben rendelkezésre, akkor az enzim  $\bullet\text{O}_2^-$ -t termel [83].

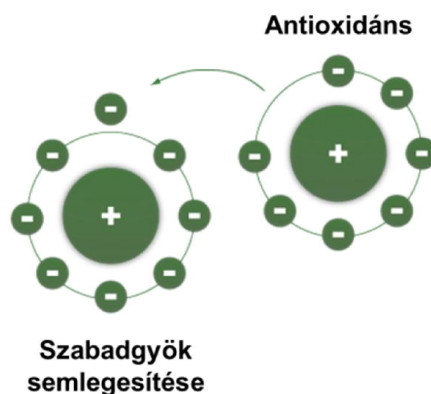


A NO a  $\bullet\text{O}_2^-$ -dal reakcióba lépve ONOO<sup>-</sup>-et képez [26], amely a  $\bullet\text{OH}$ -höz hasonlóan rendkívül reaktív [161]. A ONOO<sup>-</sup>-et a makrofágok és neutrofilek eredetileg a baktériumok elpusztítására termelik, kóros körülmények között azonban a saját sejteket is megtámadja, aktív biológiai oxidáns hatása révén lipidperoxidáció (LP), nukleinsavak károsodása, fehérjék oxidálása, nitrálása, enzimek működésének gátlása, és ioncsatornák inaktiválódása következhet be. A ONOO<sup>-</sup> alacsonyabb koncentrációban apoptózis trigger, magasabb koncentrációban nekrozist indukálhat [193].



### 3. Antioxidáns védelmi rendszer

Az evolúció során az aerob szervezetekben az oxidatív hatások ellen antioxidáns védelmi rendszer alakult ki. Az antioxidánsok olyan molekulák, amelyek bár csekély mennyiségben vannak jelen az oxidálandó szubsztráthoz képest, jelentős mértékben csökkenteni, vagy akár gátolni is képesek annak oxidációját [75], ezáltal védelmet nyújtanak az oxidációval és a szabadgyökös láncreakciókkal szemben.



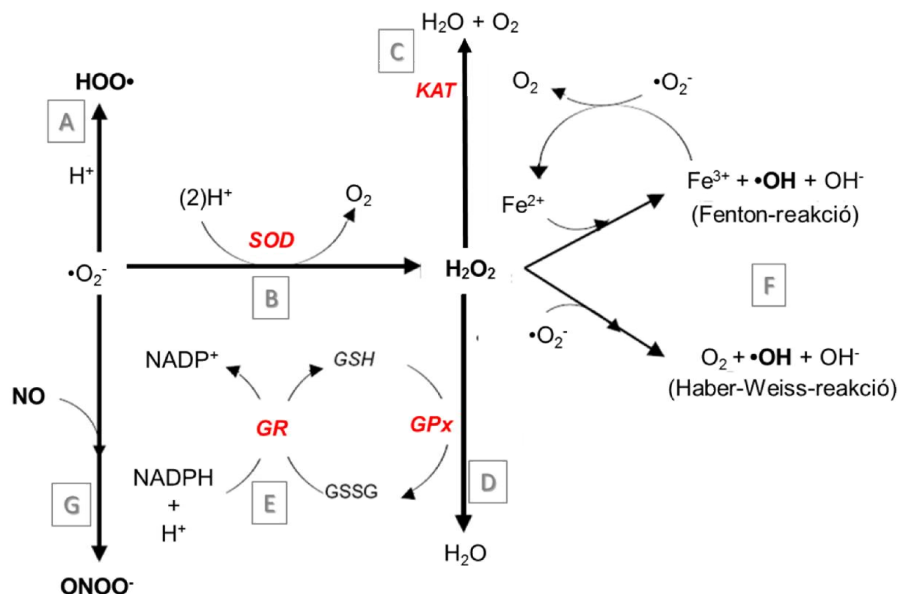
**2. ábra.** Az antioxidánsok gyök-kioltó képessége. (kép forrása: <http://replere.com/brochure/>)

Az antioxidáns védelemnek három vonala van. Az első védelmi vonalat az antioxidáns enzimek és fémkötő fehérjék alkotják. Az antioxidáns enzimek, úgymint a SOD, a kataláz (KAT), a glutation-S-transzferáz (GST) vagy a glutation peroxidázok (GPx) gyök-kioltó reakciókat katalizálnak. A láncindító reakciók megelőzése a fémionok, különösen a Cu és a Fe ionok megkötése révén valósul meg a fémkötő fehérjék, úgymint ferritin, transzferrin, cöruoplazmin vagy metallothionein (MT) közreműködésével. A fém kelátképzés központi fontosságú a lehetséges gyöktermelő reakciók, a LP és a DNS fragmentáció kontrollálásában [172].

Az antioxidáns védelem második vonalát a kis molekulatömegű antioxidánsok képviselik. Ezek a zsíroldékony (A és E-vitamin, karotinoidok) és vízoldékony (C-vitamin, húgysav, glutation) molekulák képesek megszakítani a gyökös láncreakciókat, anélkül, hogy önmaguk reaktív gyökké alakulnának. Képesek semlegesíteni olyan nagy reaktivitású szabadgyököket is, mint a  $\bullet\text{OH}$ , melyek eliminálása nem enzimatikusan történik.

A harmadik védelmi vonalban álló hősokk fehérjék, lipázok, proteázok, DNS *repair* enzimek és a glutation-reduktáz (GR) a már károsodott makromolekulák helyreállítását vagy eltávolítását végzik [109].

Az alábbi pontokban az antioxidáns védekező rendszer azon tagjait mutatom be részletesebben, amelyeket kísérleteink során vizsgáltunk.



**3. ábra.** ROS képződés és antioxidáns enzimek. (A) A szuperoxid anion ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) egy proton felvételével hidroperoxil gyökké ( $\text{HOO}\cdot$ ) alakul. (B) A  $\cdot\text{O}_2^-$  dizmutáció során molekuláris oxigénné és hidrogén-peroxiddá ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) alakul spontán, vagy szuperoxid dizmutáz (SOD) által katalizált reakcióban. (C) A kataláz (KAT) semlegesíti a  $\text{H}_2\text{O}_2$ -ot vízzé és oxigénné. (D) A glutation-peroxidáz (GPx) redukálja a  $\text{H}_2\text{O}_2$ -ot vízzé glutation (GSH) felhasználásával. A reakció során a GSH oxidálódik (GSSG). (E) A GSSG-t a glutation reduktáz (GR) visszaalakítja GSH-vá. (F) A  $\text{H}_2\text{O}_2$  átalakulhat hidroxil gyökké ( $\cdot\text{OH}$ ) a  $\cdot\text{O}_2^-$  által katalizálta Haber-Weiss-reakció során, illetve a fém-katalizált Fenton-reakcióban, ahol a  $\cdot\text{O}_2^-$  segíti az oxidált fémionok visszaredukálását pl.  $\text{Fe}^{3+}$  redukálódik  $\text{Fe}^{2+}$ . (G)  $\cdot\text{O}_2^-$  reakcióba lépve a nitrogén-monoxiddal (NO) peroxinitritet ( $\text{ONOO}^-$ ) képez. [134]

### A szuperoxid-dizmutáz (SOD)

A SOD a  $\cdot\text{O}_2^-$  dizmutációját katalizáló fémtartalmú enzim. A reakció során  $\text{H}_2\text{O}_2$  és oxigén keletkezik. Állatokban három típusát különböztetjük meg az enzim elhelyezkedése és a fém kofaktor alapján: réz-cink szuperoxid-dizmutázok (Cu/Zn-SOD), mangán szuperoxid-dizmutázok (Mn-SOD) és extracelluláris szuperoxid-dizmutázok (ec-SOD). A Cu/Zn-SOD a citoszolban [133], a Mn-SOD a mitochondriumban [220] lokalizálódik. Az ec-SOD sejten kívül elhelyezkedő glikozilált Cu/Zn-SOD [128]. A redox-aktív fémionoknak (Cu, Mn) katalitikus szerepe van, az enzim a segítségükkel közömbösíti a  $\cdot\text{O}_2^-$ -t, míg a Zn az enzimstruktúrát stabilizálja. A dizmutáció során az enzim aktív centrumában elhelyezkedő fém a reakció közben ciklikusan redukálódik és oxidálódik [39]; az első  $\cdot\text{O}_2^-$  hatására a proszterikus csoportot alkotó fémion redukálódik, míg a második hatására oxidálódik. A Cu/Zn-SOD fokozatos inaktivációjához vezethet a magas  $\text{H}_2\text{O}_2$  koncentráció, a nem enzimatis

glikoziláció és a magas ONOO<sup>-</sup> koncentráció [10, 30]. Utóbbi a Mn-SOD-ot is inaktiválhatja nitrálás során [119].

### ***A kataláz (KAT)***

A KAT a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-ot bontja vízzé és oxigénné. A tetramer szerkezetű enzim katalitikus centrumában Fe<sup>3+</sup>-t tartalmazó protoporfirin-IX foglal helyet, ahol egy időben két H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> molekula megkötődése szükséges a reakcióhoz. Az enzim elsősorban peroxiszómaokban található meg [4], de más sejtalkotókban, mint például a mitochondriumban vagy az endoplazmatikus retikulumban is előfordulhat [117]. Habár katalitikus aktivitása nagy, de szubsztrátaffinitása igen alacsony, így a reakció csak nagyobb mennyiségű H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> jelenlétében hatékony [92]. Működését a •O<sub>2</sub><sup>-</sup> képes gátolni [103].

### ***A glutation (GSH) és a GSH redox rendszer***

A GSH az egyik legfontosabb nem enzimatis antioxidáns, mely mindössze három aminosavból, glicinből, ciszteinből és glutamátból épül fel. A GSH nélkülözhetetlen a sejt alap működéséhez, ezért a szervezet vagy maga szintetizálja két lépésben, két ATP felhasználásával a  $\gamma$ -glutamil-cisztein szintetáz és a glutation szintetáz enzim segítségével, vagy táplálék útján veszi fel [49]. Jelentős mennyiségben fordul elő az állati és növényi sejtek citoszoljában, a sejtben és a mitochondriumban egyaránt. A stresszhatások elleni védekező reakciók egyik fontos komponense. A GSH egy szabad -SH csoporttal rendelkezik, mely nehézfém terhelés esetén fémionok kötésére képes. Oxidatív stressz esetén könnyebben oxidálódik, mint a sejt fehérjéi, és a már „gyökösített” DNS-t is képes visszaredukálni [92]. Számos, az oxidatív stressz elleni védelemben szerepet játszó enzim kofaktora. A GPx szubsztrátjaként részt vesz a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> és a szerves lipid-peroxidok redukálásában, a GST szubsztrátjaként a xenobiotikumok semlegesítésében, regenerálni képes a C- és E-vitamint [132]. E reakciók során két GSH molekula glutation diszulfiddá (GSSG) oxidálódik, amelynek felhalmozódása citotoxikus.

A GSH redox ciklusát a GR a GPx-zal együttműködve biztosítja [92]. A GPx enzimes család tagjai H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, alkoholok és szerves hidroperoxidok redukálására képesek GSH oxidálódása közben [56]. A katalízisért az aktív centrumban megtalálható szelenocisztein felel [60]. A GPx enzimek a sejtben ott töltnek be elsődleges védelmi funkciót, ahol a KAT csak kis mennyiségben van jelen, vagyis a citoplazmában és a

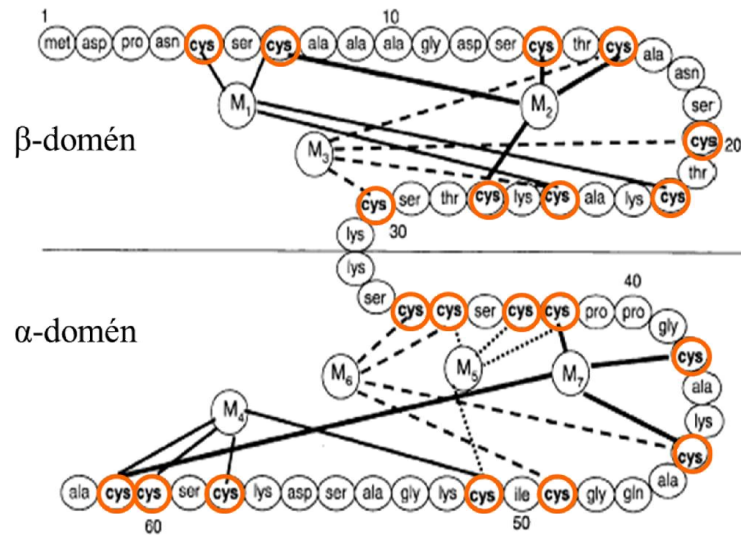
mitochondrium mátrixban. A GR H-donorként NADPH-t használva a GSSG-t GSH-vá redukálja. Prosztetikus csoportja egy flavin-adenin-dinukleotid [33]. A szükséges NADPH-t a hexóz-monofoszfát sönt biztosítja. A GR működését főként a NADPH és a GSSG koncentrációja határozza meg, vagyis ha a sejten belüli NADPH kevés, és nincs GSSG, akkor inaktíválódik az enzim. Ennek következtében nő a GSSG koncentrációja, ami újra aktiválja a GR-t [114].

A GSH redox rendszer változásai alkalmasak lehetnek a szabadgyökök által kiváltott oxidatív stressz mértékének követésére. A GSH/GSSG arány jól mérhető és kóros állapotokban tükrözi a szervezetben kialakuló oxidatív folyamatok intenzitását [94]. Az arány csökkenése a GSH fokozott oxidációjára utalhat, melyet bármely, a sejtet érő oxidatív stresszhatás előidézhethet. Az arány növekedése ugyanakkor csökkent GPx aktivitásra, valamint a GSH szintézis fokozódására is utalhat.

### ***Metallothioneinek (MT)***

A MT-ek kis molekulatömegű, ciszteinben gazdag fémkötő fehérjék. Kinetikailag labilis fémkötéseik révén nagy mennyiségben képesek a fémionok raktározására, szállítására az élő szervezetben. Szerkezetük alapján három nagy csoportba sorolhatók [62]. Munkánk során az I. csoportba tartozó MT-vel foglalkoztunk.

A MT I-es csoportba 6-7 kDa molekulatömegű, 60-64 aminosavból álló, magas fémtartalmú polipeptidek tartoznak. Négy fő formáját különböztetjük meg: az állatvilágban általánosan előforduló MT-1 és MT-2 mellett emlősökben azonosították még a központi idegrendszerre specifikus MT-3-t [203], valamint a pikkelyes hámsejtekre jellemző MT-4-et kódoló gént is [168]. Aminosav összetételükre jellemző, hogy 20 ciszteint, 6-8 lizint és 7-10 szerint tartalmaznak. Nem, vagy csak alig fordulnak elő bennük aromás aminosavak és hisztidin [77]. A ciszteinek elhelyezkedése a polipeptidláncon belül konzervált; a Cys-x-Cys, Cys-x-x-Cys illetve Cys-Cys motívumok a fémionokkal térhálós fém-tiolát komplexbe rendeződnek. A MT-ben tiolát-ligand formájában 7 fémion van kötve, amelyek két klaszterbe rendeződnek [97]. A két fémkötő domén egymástól jól elkülöníthető: a fehérje N-terminális része a  $\beta$ -domént foglalja magába, ahol 9 darab cisztein 3 fémion kötésében vesz részt, míg az  $\alpha$ -doménnek nevezett C-terminális régióban 11 darab cisztein 4 fémionnal létesít kötést. A domének közötti összekötő régió konzervált Lys-Lys részből áll [150].



**4. ábra.** A MT elsődleges szerkezete. A narancssárga szín a ciszteineket, az M a körök közepén a megkötött fémionokat jelzi. A vonalak a ciszteinek és a fémek közötti tetrahedrális kötéseket reprezentálják [147].

A MT-ek szulfhidril csoportjaik révén képesek a fémionok gyors megkötésére, tárolására és szükség esetén leadására, ezzel biztosítva az esszenciális Zn és Cu megfelelő időbeni és térbeni eloszlását, valamint a toxikus fémionok megkötését. A kötött fémionok, a szulfhidril csoportok nagy reaktivitása miatt egy folyamatos transzfer reakció részei, mivel a Cys-Fém(III)-Cys keresztkötések állandó felbomlása és újraszerveződése lehetővé teszi a fémionok kicserélődését. Ez végbemehet egy MT molekula egyik doménjén belül, a domének között, továbbá MT molekulák, illetve az MT és más metalloproteinek között is. Ez a nagyfokú fémkötő affinitás és dinamikus fluktuáció teszi őket alkalmassá arra, hogy döntő szerepet töltsenek be az esszenciális fémek homeosztázisának fenntartásában. A fémkötés mellett jelentős szerepe van a szabadgyökök ( $\bullet\text{O}_2^-$ ,  $\bullet\text{OH}$ ) semlegesítésében is. A  $\bullet\text{OH}$ -kel való reakciójának sebességi állandója jóval nagyobb, mint a  $\bullet\text{O}_2^-$ -kel. [227].

### ***Hemoxigenázok (HO)***

A HO enzimsaládnak három tagja ismert, melyeket három különböző gén kódol. A HO-1 és HO-2 hasonló fizikai és kinetikai tulajdonságokkal rendelkezik, de különböző módon szabályozódnak, eltérő élettani szerepet töltenek be és különböző szöveti eloszlást mutatnak [121]. A HO-3 90%-os homológiát mutat a HO-2 enzimmel, a katalitikus aktivitása azonban alacsonyabb [225].

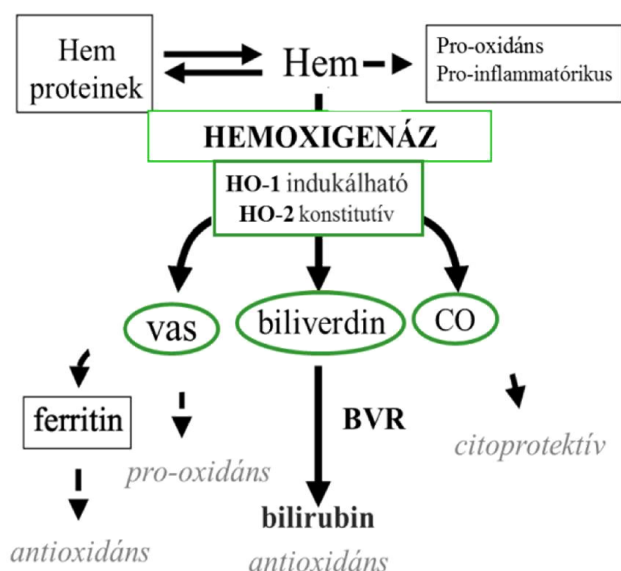
A HO-1 fiziológias körülmények között a legtöbb szövetben alacsony szinten expresszálandó, indukálható forma. Általánosságban elmondható, hogy alap expressziója

lépben és a májban nagyobb, mint a többi szervben [42, 164]. A HO-1 egy hőszok fehérje (HSP 32), mely számtalan stimulus hatására indukálódik, úgymint nehézfémterhelés, hőszok, ischémia, GSH szint csökkenés, sugárzás, hipoxia, hiperoxia és egyéb patológiás állapotokat okozó inzultusok [120]. Expressziója elsődlegesen transzkripcionális szinten szabályozott [188]. A HO-1 az oxidatív stressz elleni védekezés mellett szerepet játszhat többek között bizonyos növekedési faktorok mediálásával az angiogenezisben [34], funkcionálhat különböző gyógyszerek mediátoraként vagy transzkripciós faktorként is [110]. Jelenlétét a sejtmembránban is kimutatták, ahol celluláris pumpaként működve Fe-t juttat ki a sejtől az extracelluláris térbe [19].

A HO-2 fehérje elsődleges struktúrája, molekulatömege és hőstabilitása különbözik a HO-1-től. A HO-2 fehérjét kódoló gén konstitutívan expresszálódik, kevésbé indukálható különböző faktorok által [122]. Sejten belül a mitochondriumokban helyezkedik el membránba ágyazottan [120], expressziója főként poszt-transzkripcionális szabályozás alatt áll [42]. Újabb kutatási eredmények feltételezik az oxigén koncentráció detektálásában való részvételét is, ami által a sejt oxigén szenzoraként működhet [185]. Ellentétben a HO-1-gyel, amelyből hiányzik a cisztein, a HO-2 három cisztein tartalmú Cys-Pro (CP) motívumot tartalmaz. A CP motívumok hem szabályozó motívumok (HRM-ek) központi szekvenciái, amelyek tiol/diszulfid redox kapcsolóként működve szabályozzák a hem kötődését a HO-2 enzimhez oxidatív stresszre és redukzív körülményekre adott válaszreakció során. Amikor a sejtek ki vannak téve az oxidatív hatásoknak, akkor a HRM-ek C-terminálisán lévő ciszteinek diszulfid állapotban vannak, amely kedvez a hem kötésnek, azonban redukáló körülmények között, az alacsonyabb affinitású ditiol állapot van túlsúlyban [229]. HRM-hem kölcsönhatások olyan fehérjék aktivitását és/vagy stabilitását szabályozzák [105], melyek központi szerepet játszanak a fehérjeszintézis és hem hozzáférhetőség koordinálásában [185], valamint a Fe és a hem homeosztázis szabályozásában [228].

A HO-k által katalizált reakcióban a hem ekvimoláris mennyiségű Fe-ra, biliverdinre és szénmonoxidra (CO) bomlik [195]. A Fe főként az új hem szintézisében használatos fel, míg a biliverdin bilirubinná alakul a nagy feleslegben jelenlévő biliverdin-reduktáz (BVR) által katalizált reakció során [104]. A CO a keringő hemoglobinhoz kötődik, majd a léggéssel távozik a szervezetből (5. ábra). Mivel nem ismert más enzim, amely lebontja a sejtekben a hemet, így a HO-k legfontosabb funkciója fiziológiai körülmények között az előregedett vörösvértestekből származó

hem reciklizációja. A hem mellett, hogy részt vesz a Fe raktározásában, döntő szerepet játszik különböző élettani folyamatokban is, például számos elektron transzferben szerepet játszó és redox reakciókat katalizáló enzimhez kapcsolódik, valamint olyan fehérjéket kódoló géneket szabályoz, melyek fontosak az alacsonyabb rendű eukarióták és prokarióták oxigén felhasználásában [167]. A szabad hem nagyobb koncentrációban mérgező lehet, ahogyan egyik bomlásterméke, a szabad Fe is. A redox-aktív Fe jelentős mértékben hozzájárul a  $\bullet\text{OH}$  fokozott termelődéséhez a Fenton-reakció során. Ugyanakkor a Fe létfontosságú elem minden élő szervezet számára, mivel kofaktora számos hem-tartalmú fehérjének, Fe-S klasztereket képez sok nem hem-tartalmú fehérjében, és biztosítja az oxigén szállítását és tárolását a hemoglobinban és mioglobinban. A hem és a Fe ellentmondásos biológiai funkciója miatt ezek metabolizmusa az emlősökben igen szigorúan és finoman szabályozott.



**5. ábra.** A hem degradáció. A HO-k által katalizált reakció során bioaktív molekulák - biliverdin, CO és Fe - képződnek. A biliverdin a biliverdin-reduktáz (BVR) segítségével bilirubinná alakul. A Fe-t a ferritin megköti. A CO másodlagos hírvivőként töltheti be szerepét. A hem és bomlástermékei számos fiziológiás tulajdonsággal rendelkeznek, de emellett bizonyos esetekben mérgezőek is lehetnek [214].

A sejtekben a HO-k által katalizált hem degradáció során képződik a legnagyobb mennyiségű CO, ami endogén mediátorként fontos szerepet játszik a különböző élettani folyamatokban. Fiziológiás mennyiségben számos jelátviteli útvonalat befolyásolhat; kiválthatja a cGMP termelődését, serkenthet bizonyos neuronális jelátviteli folyamatokat és szabályozhat olyan érrendszeri funkciókat, mint az értónus vagy a



simaizom-proliferáció. Citoprotektív hatását a sejtekben gyulladáscellenes, anti-apoptotikus és anti-proliferatív tulajdonsága révén fejtheti ki [54, 176].

A bilirubin a hem metabolizmus végterméke, a biliverdinből a BVR által katalizált reakció során keletkezik. Sejtvédő hatását antioxidáns tulajdonsága közvetíti. Hatékony peroxil-gyök-fogó, redukáló hatása révén képes a gyökös láncreakciók megszakítására [192], mérsékli az oxidánsok hatására bekövetkezett károsodást a sejtekben, képes csökkenteni a LP mértékét [120, 143, 192]. Nagyobb koncentrációban azonban toxikus.

#### 4. Oxidatív stressz

ROS molekulák a különböző biokémiai reakciók során, fiziológias körülmények között is termelődnek. Bizonyos körülmények között azonban képződésük fokozódik, és koncentrációjuk már meghaladhatja a sejtek szükségleteit. Ha a ROS koncentráció kezdeti növekedése mérsékelt, akkor az antioxidáns válasz elegendő lehet, hogy kompenzálja ezt a növekedést és visszaállítsa az eredeti egyensúlyt a ROS képződése és semlegesítése között. A túlzott mértékű és tartós ROS képződés és/vagy a gyök-kioltó kapacitás csökkenése azonban felborítja a prooxidánsok és antioxidánsok közötti egyensúlyt, ami a prooxidánsok javára tolódik el. Ebben az esetben oxidatív stressz alakul ki, mely a makromolekulák károsodásához vezethet [187]. A membránlipidek károsodása a LP következtében megy végbe. E folyamat során megbomlik a plazmamembrán integritása, ami további irreverzibilis szövet- és szervkárosodást okozhat. A LP során számos citotoxikus termék keletkezhet, melyek között lehetnek aldehidek, dialdehidek és hidroxialdehidek, melyek károsítják a DNS-t is. Ez mutációkhoz és a sejt működés zavarához vezet [12]. A ROS ezen kívül a fehérjéket is károsíthatja. Nagymértékű károsodás következtében a sejt alapvető életfunkciói sérülhetnek és a sejt apoptotikus vagy nekrotikus halála következhet be.

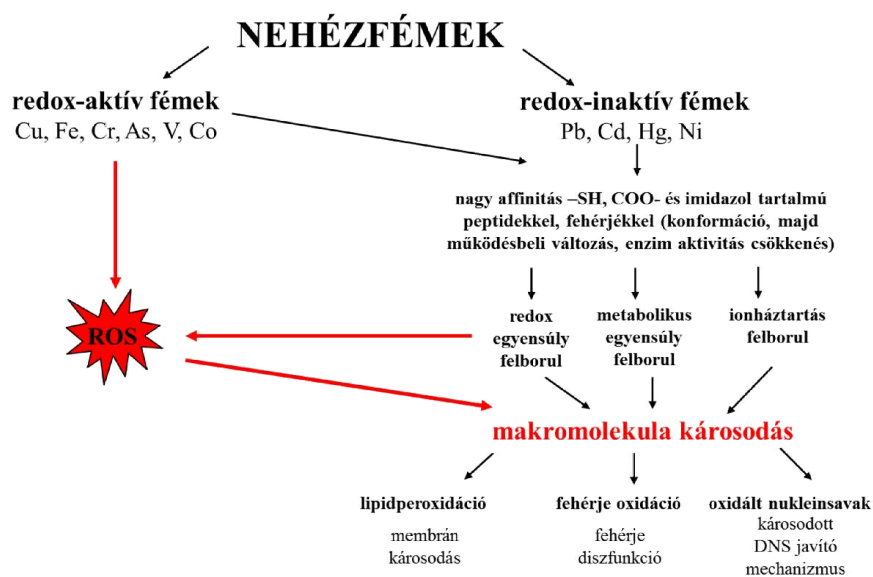
Munkánk során a ROS képződést, az oxidatív stressz okozta károsodást és az antioxidáns védekező rendszer aktiválódását tanulmányoztuk kétféle patológias folyamatban. Vizsgáltuk a nehézfém indukálta válaszreakciót halakban és a diabétesz hatását patkányban. A továbbiakban e két patológias folyamat irodalmi hátterét ismertetném.

### A nehézfémek és az oxidatív stressz

Ahogy világszerte, úgy hazánkban is komoly problémát jelent a vizek nehézfém szennyezettsége, ezért a nehézfémek élőlényekre gyakorolt hatásainak pontos feltérképezése elengedhetetlen. Nagy mennyiségű előfordulásuk a környezetben egyrészt természeti adottságok függvénye, másrészt antropogén tevékenység következménye [44].

A fiziológias szöveti működés alapvető feltétele a szervezet megfelelő redox-homeosztázisa, melynek fenntartásában a katalitikus szerepet betöltő esszenciális nehézfémek (Fe, Zn, Cu) is fontos szerepet játszanak. Ezek a sejten belül ionok formájában vannak jelen különböző oxidációs állapotban. Általában közvetlenül kötődnek egy fehérje oldalláncához vagy kofaktorként beépülnek kelátképző gyűrűkbe. Az esszenciális fémek akkor válnak toxikussá, amikor a szükségesnél nagyobb mennyiségben vannak jelen. A biológiai funkcióval nem rendelkező nehézfémek, mint pl. az Pb, a Hg, a Cd, vagy az As jelenléte az élő szervezetben már kis mennyiségben is káros. Mivel nem biodegradálhatók, a szervezetbe jutott toxikus nehézfémek felezési ideje és ürülése rendkívül lassú folyamat [28].

A nehézfém ionokat redox jellegük alapján két csoportba sorolhatjuk. A redox-aktív fémek, mint a Fe, a Cu, a Cr, az As és V a Haber-Weiss- és a Fenton- reakciókat katalizálhatják. A redox-inaktív fémek, mint a Pb, a Cd és a Hg célpontjai a fehérjék, amelyekhez nagy affinitással kötődve konformáció-, majd működésbeli változást, enzimeknél aktivitás csökkenést idéznek elő (6. ábra).



6. ábra. A nehézfém ionok által indukált stressz okozta károsodások főbb mechanizmusai [186 alapján].

A Cd jelentős mennyiségben fordul elő a természetben, fokozott megjelenése az emberi tevékenység okozta szennyezés következménye, széles körben használják színezőanyagokban és festékekben, cementben és foszfát tartalmú műtrágyákban [89]. A Cd az egyik legveszélyesebb, toxikus és karcinogén hatású nehézfém. Cd-stressz következtében zavart szenvedhet az immunrendszer működése, károsodhat a vese, a máj, a tüdő és a csontozat is [90, 146].

Mivel redox-inaktív fém, nem képes közvetlenül szabadgyököt generálni, nem vesz részt a Fenton-reakciókban [213]. Közvetett módon azonban oxidatív stresszt indukál a redox-aktív fémek antagonistá tulajdonsága révén, a gyökfogó kapacitás kimerítésével, az antioxidáns enzimek gátlásával, és az elektrontranszport lánc gátlása során kialakuló mitochondriális károsodás által [45, 197].

A Cd képes a Fe helyébe lépni, kiszorítva azt olyan vaskötő fehérjékből, mint a ferritin és a transzferrin, ezáltal növelve a rendelkezésre álló szabad Fe-at a sejtekben. A redox-aktív Fe pedig a Fenton-reakción keresztül oxidatív stresszt indukál [38]. Cink-antagonista hatása révén olyan biológiai funkciók sérülhetnek, melyekben cinktartalmú enzimek játszanak kulcsfontosságú szerepet [161]. A Cd más módon is képes az oxidatív stressz indukálására. A Cd tiol és szerves szulfhidril vegyületekhez kötődik Cd-tiol komplexeket képezhet [206]. A fő tiol tartalmú antioxidáns a GSH az elsődleges célpontja a szabad Cd ionoknak. A GSH szerepe kettős; közvetlenül megköti a Cd-ot, valamint képes hatástalanítani a ROS-t. A GSH készlet kimerülése következtében a -SH szint csökken. Ezáltal a Cd hatástalanítása nem megfelelő, ami zavart okozhat a sejtek redox egyensúlyában. A Cd kettős hatást fejt ki az antioxidáns védekezésre: egyrészt gátolhatja egyes antioxidánsok működését, másrészt viszont, a redox-egyensúly zavara és a folyamatosan indukált jelátviteli kaszkád aktiválhat több antioxidáns mechanizmust. A Cd kovalens kötést alakíthat ki más -SH-t tartalmazó peptidekkel, fehérjékkel is, pl. a MT-vel [232]. A bélén keresztül felszívódott Cd elsőként a májba jut, ahol GSH-hoz és MT-hez kötődik. Ezt követően kiválasztódik az epébe vagy elszállítódik és raktározódik a vesében Cd-GSH [58] vagy Cd-MT komplexek formájában [196].

A Cd nem csak az antioxidáns védelmi mechanizmusokat zavarja, hanem a mitochondriális elektron transzport lánc működését is. A Cd okozta ROS-termelés egyik lehetséges útja az elektron transzfer zavara, ami révén felhalmozódó instabil szemiubikinonok átadnak egy elektront a molekuláris oxigénnek, ami a  $\bullet\text{O}_2^-$  kialakulását eredményezi [218].

Az As természetes előfordulása a környezetben elsősorban a geológiai adottságok függvénye. A Föld különböző pontjain a mélységi vizekben (India, Kína, Tajvan, Japán, Mexikó, Chile, Argentína, USA, Magyarország egyes részein) veszélyes mennyiségben fordul elő. A levegőben, különösen a városok és az ipari területek közelében magas a koncentrációja. Több iparág is alkalmazza az As-t és vegyületeit; használják a kártevők elleni szerek készítésénél, vagy a gyógyszeriparban és elektronikai iparban is. Karcinogén tulajdonsága révén növeli a tüdő-, a vese-, és a bőrrák kockázatát [137], de hozzájárul a szív-, és érrendszeri betegségek [145], a cukorbetegség [53], idegrendszeri zavarok [205] és egyéb bőrbetegségek [40] kialakulásához is. Toxikus hatása révén sejtszinten számos mechanizmus zavarát okozhatja. Kromoszóma aberrációkat és mutációkat indukálhat, módosíthatja a jelátviteli folyamatokat, a sejtciklus szabályozását, a sejtek differenciálódását, illetve befolyásolhatja az apoptózist. Közvetlen oxidatív károsodást okoz, károsítja a membrán lipideket, fehérjéket, a DNS-t és génexpressziós változásokat idéz elő [144].

A szervetlen As vegyületek metabolizmusa során a sejtekben fokozódik a ROS képződés [184]. Az As morfológiai változásokat indukál a mitochondriumokban, ezáltal gyorsan csökken a mitochondriális membránpotenciál, ami kontrollálatlan  $\bullet\text{O}_2^-$  termelődéshez [118], valamint  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\bullet\text{OH}$  és  $\text{NO}$  képződéshez vezet [72, 118, 217]. Az As a HO-k működésén keresztül szintén fokozhatja a ROS termelődést, ami a túlzott mértékű redox-aktív Fe felszabadulás következménye [111]. Továbbá *in vitro* kísérletek igazolták, hogy az exogén As-vegyületek fokozott Fe felszabadulást okoztak ferritinből [5]. A szabad Fe részt vesz a  $\bullet\text{OH}$  képződését eredményező Fenton-reakcióban [102].

A GSH szint, mely jelentős markere az oxidatív stressznek, szoros összefüggést mutat az As által indukált redox állapottal a sejtben. Az As vegyületek tiol-reaktivitása nagy, az As expozíciót követően csökken a GSH szint [125], s ezzel oxidatív stressz kialakulását okozza. Több útvonal ismert, melyen keresztül az As csökkentheti a sejt GSH szintjét. A GSH elektron donorként működhet, amely során az  $\text{As}^{5+}$  átalakul  $\text{As}^{3+}$ -té [57]. Az  $\text{As}^{3+}$  nagy affinitással köt a GSH-hoz As-GSH komplexet képezve, amely szubsztrát az ABC (*ATP-binding cassette*) membrán transzporterek számára és a sejtekből való kiáramlását közvetíti [106]. Emellett az As hatására képződő szabadgyökök is oxidálják a GSH-t.

Az As kovalens kötést alakíthat ki más  $-\text{SH}$ -t tartalmazó peptidekkel, fehérjékkel [11, 180], ami a fehérjeszerkezet torzulásához és az enzimaktivitás elvesztéséhez vezethet. A MT-vel szintén kölcsönhathat [155], amelyek részt vehetnek

az  $As^{5+}$  redukálásában  $As^{3+}$ -té, akárcsak a GSH, de szintén képezhet komplexet velük. Az As transzkripció szinten szabályozza az *mt* gének expresszióját, patkányban például az *mt* expresszió 20-szoros növekedését mutatták ki májban As-kezelést követően [123].

### ***A cukorbetegség és az oxidatív stressz***

A cukorbetegség az egyik leggyakoribb krónikus betegség világszerte, amelyet elismerten a vezető halálokok egyikeként tartanak számon (American Diabetes Association, 2010). A cukorbetegségekre jellemző a krónikusan magas vércukorszint, a szénhidrát-, a zsír-, és a fehérje-anyagcsere rendellenességei, azonban nem egy egységes kórkép. Azoknak a betegségeknek az összefoglaló neve, amelyekben fennáll a hiperglikémia, és amelyek háttérében az abszolút vagy relatív inzulinhiány áll. Kísérleti és klinikai vizsgálatok eredményei szolgálnak bizonyítékkal arra, miszerint az oxidatív stressz központi szerepet játszik a cukorbetegség patogenezisében, szövődményeinek kialakulásában és progressziójában [149].

A diabétesz *in vivo* vizsgálata során nélkülözhetetlen a cukorbeteg állatok kísérletes alkalmazása. Diabéteszes állatok létrehozására már évtizedek óta két vegyületet, az alloxant és a streptozotocint (STZ) használják. Ezek injektálása a Langerhans-szigetek inzulintermelő  $\beta$ -sejtjeit szelektíven pusztítja [207], s ennek következtében egy inzulinfüggő 1-es típusú diabétesz-szerű szindrómát okoz. A betegség vizsgálatára más lehetőség is van. A kémiai indukált diabéteszes állatokon kívül lehetőség van a spontán autoimmun diabéteszes modellek vagy transzgenikus állatok alkalmazására is. Munkánk során mi a STZ-nal indukált diabétesz modellt alkalmaztuk. A STZ a megfelelő dózisban alkalmazva szabadgyökös reakciókat indukál és befolyásolja az antioxidáns enzimek aktivitását. 48 óra alatt kiürül a szervezetből, így a cukorbetegség későbbi vizsgálata során ezek a korai változások már nem befolyásolhatják a kísérlet eredményeit [130].

A cukorbetegség egyik súlyosabb következménye a hosszú távú érrendszeri szövődmények kialakulása. A "mikrovaszkuláris betegség", azaz a kis erek károsodása és a "nagyérbetegség", vagyis az artériák károsodása gyakori és legalább részben a krónikus vércukorszint emelkedés következménye. A mikrovaszkuláris komplikációk körébe tartozó retinopátia akár teljes látásvesztéssel, a nefropátia veseelégtelenséggel, a neuropátia pedig idegi károsodással is járhat. Az autonóm neuropátia számos gasztrointesztinális tünet megjelenéséért felelős. A nagyérbetegség szövődményei, a szív- és érrendszeri betegségek következtében fellépő szívinfarktus, az agyérbetegségek,

mely stroke formájában nyilvánul meg, valamint a végtagok artériáinak patofiziológiás károsodása. Ezekre nagyfokú érlemezésedés, ateroszklerotikus plakkok jelenléte jellemző.

A szövődmények kialakulása és progressziója mindig több, egymással összefüggő folyamat eredménye, de valószínűleg a leglényegesebb faktor a magas vércukorszint. A diabéteszes szövődmények megelőzésének, késleltetésének és a már létrejött komplikációk fokozódásának megakadályozásának legfontosabb eszköze a vércukorszint kontrollja [93]. Inszulinkezeléssel hosszútávon elérhető és fenntartható a normoglikémiás állapot, azonban szigorú kontroll mellett is tapasztalható szövődmények kialakulása.

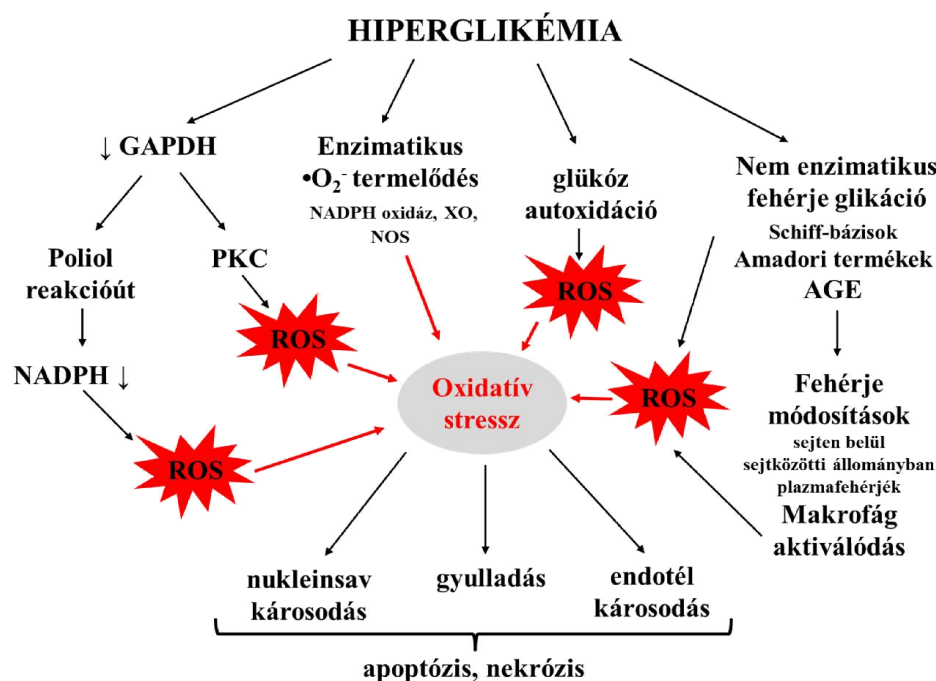
A cukorbetegség korai szakaszában elsősorban a hiperglikémia okozta akut és reverzibilis intracelluláris változások, valamint a főbb anyagcsere utak zavarai játszanak szerepet a patofiziológiai eltérések kialakulásában (7. ábra). A magas glükóz koncentráció közvetlenül képes fokozni a ROS termelődését. A glükóz autoxidációja során  $\cdot\text{OH}$  keletkezik [202]. Az emelkedett vércukor-koncentráció felelős azért is, hogy a fehérjékből korai glikációs termékek (*EGPs-Early Glycation Products*) képződjenek. Ezek a Schiff-bázisok, melyekben a kémiai kötések egy lassú folyamatban átrendeződnek, ketoamin típusú kötés alakul ki, és Amadori termékek képződnek. Minél nagyobb a glükóz koncentráció és minél hosszabb ideig áll fenn a hiperglikémia, annál több EGP keletkezik. További kémiai átalakulások során előrehaladott glikozilációs végtermékek (*AGEs-Advanced Glycosylation End products*) képződnek, melyek képesek hosszú élettartamú fehérjékhez kapcsolódni és ezáltal irreverzibilis károkat okozni [127]. Sejtfelszíni receptorokhoz kötődve is kifejthetik hatásukat: fokozhatják a citokin termelődést, csökkenthetik az intracelluláris kalciumot, és hatásukra megjelenhetnek adhéziós molekulák az érendotélien [136, 166]. Az AGE-k a diabétesz viszonylag rövid fennállása után is kialakulhatnak [32], s ha meg is szűnik a hiperglikémia, ezek a termékek már nem bomlanak le. Diabétesz során változások figyelhetők meg a szérum lipid összetételében, mint például az alacsony sűrűségű lipoprotein (LDL) koncentrációjának növekedése. Hiperglikémia következtében ezek glikozilációja és oxidációja következhet be [85]. Az oxidált LDL (oxLDL) celluláris és humorális immunválaszt vált ki [79]. A LP során keletkezett oxidált koleszterin például elősegíti az apoptózist, míg az oxidált fosfolipidek indukálhatják a kemoattraktáns molekulák szekrécióját, vagy a növekedési faktorok termelődését. Ezek elősegítik a monociták átalakulását makrofágokká [23], melyek amellet, hogy ROS-t, proteázokat

és különböző citokineket termelnek, receptorokat is expresszálnak. E receptorok egyik fajtája a *scavenger* receptorok családja, melyekre jellemző, hogy általuk a makrofágok nagy affinitással veszik fel az oxLDL-t minden más, a szervezet számára haszontalan és káros anyaggal együtt. Ez a fajta koleszterin felvétel a specifikus LDL receptor működésével szemben korlátlanul megy végbe. A telített sejtek, melyekre habos citoplazma jellemző, ateroszklerotikus plakkokat képeznek [29].

A glükóz elsősorban a glikolízis során metabolizálódik, de létezik más útvonal is, amely során lebomlik. Nevezetesen a poliol útvonal. A glükóz molekulából az aldóz-reduktáz által katalizált reakció során szorbitol keletkezik NADPH felhasználásával. Élettani körülmények között is megfigyelték a poliol út működését, mivel szerepet játszik a méregtelenítésben, az aldóz-reduktáz enzim aldehideket alakít inert alkoholokká. Hiperglikémia következtében a glükóz koncentráció intracellulárisan is növekszik olyan sejtekben, ahol a cukorfelvétel nem inzulinfüggő. Ebben az esetben fokozott aktivitással működik az aldóz-reduktáz, a szorbitol képződés fokozódik, s mivel nehezen jut át a membránon, felhalmozódik a sejtekben ozmotikus stresszt indukálva. Emelkedett intracelluláris koncentrációja a mitochondriális elektrontranszportlánc számára feleslegben biztosítja a NADH-t, amely a légzési lánc I. komplexének szubsztrátja. A fokozottan működő aldóz-reduktáz felhasználja a NADPH-t, ami változást okoz a sejt redoxpotenciáljában, gátolja az antioxidáns kapacitást csökkentve a redukált GSH mennyiségét és a GPx aktivitását.

A mitochondriális légzési lánc egy másik nem enzimátikus forrása a ROS-nak. Az oxidatív foszforiláció során elektronok jutnak át az oxigénre elektron donorokról, a NADH-ról és FADH<sub>2</sub>-ről, a belső mitochondriális membrán négy komplexe révén, ATP generáló folyamatban [70]. Normál körülmények között a keletkezett •O<sub>2</sub><sup>-</sup>-t azonnal eliminálják a természetes védekező mechanizmusok. A hiperglikémia indukálta •O<sub>2</sub><sup>-</sup> termelődés a mitochondriumban a kiváltó oka a diabétesz okozta oxidatív stressz ördögi körének [31, 151].

A cukorbetegség következtében fellépő fokozott ROS képződés enzimátikus forrásai közé tartozik a NOS, NADPH-oxidáz és a xantin-oxidáz. Minden NOS izoforma megfelelő működéséhez szükség van a szubsztrátra, a kofaktorokra és proszтетikus csoportokra. Hiányuk esetén az enzim NO helyett •O<sub>2</sub><sup>-</sup>-t termelhet [83]. NADPH-oxidáz az egyik fő forrása a •O<sub>2</sub><sup>-</sup>-nak. Aktivitása szignifikánsan magasabb volt a diabéteszes betegekből nyert vaszkuláris szövetekben [73].



7. ábra. A magas vércukorszint okozta mitochondriális szuperoxid túltermelés lehetséges mechanizmusai és következményei

Az oxidatív stressz szerepe a diabétesz patogenezisében és szövődményeinek kialakulásában egy intenzíven kutatott terület, számos kutatás irányult különféle, antioxidáns státuszt jellemző biokémiai paraméter vizsgálatára. A különböző antioxidáns enzimek aktivitása általában megváltozik diabéteszes állatmodellekben, azonban a vizsgálatok eredményei számos esetben egymásnak ellentmondanak [100, 126, 171]. Ennek oka lehet a kísérleti körülmények sokfélesége; hogy a kutatók melyik enzimet melyik szövetben vizsgálták, milyen hosszú ideje állt fenn a diabéteszes állapot és milyen modellt használtak.

*In vivo* vizsgálatok során a SOD és a KAT aktivitásának növekedését mutatták ki bélben [22]. Ez a változás létrejöhetett a glükóz autoxidáció és nem enzimatisz glikáció során fokozódó  $\bullet\text{O}_2^-$  termelődése következtében. Legtöbbször mégis a SOD aktivitás csökkenését mutatták ki STZ-kezelt cukorbeteg patkányok szerveiben [131], mely háttérében a ROS közvetlen hatása állhat. Az extracelluláris SOD-ot vizsgálva nagy arányban találtak glikozilált enzimet cukorbetegekben [2]. Az eredmények arra utaltak, hogy a sejtek felszínéhez kapcsolódó, azokat az extracelluláris gyökökkel szemben védő aktív SOD mennyisége csökkenhet diabéteszben, ezáltal érzékenyebbé téve a sejteket  $\bullet\text{O}_2^-$ -dal szemben.



Más vizsgálatok eredményei GSH tartalom csökkenését mutatták, illetve a GPx és a GR aktivitásának csökkenését is megfigyelték a STZ-indukálta cukorbetegség hatására különböző szövetekben [141]. Egyes vizsgálatok közvetetten a GSH szintézis defektusára utalnak, míg mások megállapították, hogy a glükózzal, glükóz-6-foszfáttal és fruktózzal való inkubáció a GR enzim aktivitást időfüggően csökkentette, amiért az enzim glikozilációja felelős [24].

Az MT a sejt antioxidáns védelmi rendszerének részeként védi a szöveteket az oxidatív stressz okozta károsodások különböző formái ellen [231]. Mivel az MT egy erős, endogén és indukálható antioxidánsa a különböző szöveteknek, ezért a kutatók úgy vélik, hogy hatékony antioxidáns lehet a diabéteszes szövődmények megelőzésében. Kimutatták, hogy az MT közvetlen védelmet nyújt a cukorbetegség által kiváltott kardiomiopátiával és nefropátiával szemben [107]. Azonban a bélben betöltött szerepét eddig csak gyulladásoz betegségekben vizsgálták [212].

A HO enzim rendszer szerepét is kimutatták már diabéteszben. A magas vércukorszint szabályozhatja a HO-1 fehérje kifejeződését különböző diabéteszes állat modellekben [86]. Indukálódását kimutatták többek között vesében [1], májban [41], szívben [113] és bélben [163]. A HO-2 szerepe a sejtekben még kevésbé ismert. Citoprotektív hatása egyrészt a HRM által közvetített mechanizmusnak tulajdonítható, melyen keresztül válaszol a sejten belüli redox változásokra. Másrészt az enzim reakció során keletkező két termékének, a biliverdinnek és a CO-nak is tulajdonítható. [55]. Számos kutatócsoport érvelt amellett, hogy a HO szerepe káros, de elsősorban a hemből felszabaduló szabad Fe toxikus tulajdonsága miatt [174]. Ha a ferritin szintézis és más antioxidánsok expressziója nem fokozódik, az károsíthatja a környező szöveteket. Legújabb eredmények azt mutatják, hogy a HO prooxidáns hatása függhet a szöveti mikrokörnyezettől és a betegség típusától [50].

### III. CÉLKITŰZÉS

Munkacsoportunk fő kutatási területe az oxidatív stressz indukálta molekuláris védekező mechanizmusok vizsgálata. Munkánk során a nehézfém terhelés és a hiperglikémia hatását tanulmányoztuk, párhuzamosan vizsgálva a szabadgyökök képződését, az antioxidáns védekező rendszer szerepét, valamint az oxidatív károsodás mértékét.

#### 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:

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

#### B. STZ-indukálta diabétesz hatása patkány bélben

Korábbi kísérleteink eredményei szerint a különböző bélszakaszokban megfigyelt patológiás változások a diabétesz során colon-ileum-duodenum tengely mentén grádiens-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:

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

## IV. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### 1. Kísérleti állatok és kezelési körülmények

#### *Pontyok nehézfém-kezelése*

A dolgozatom első részét képező halas kísérleteket ponttyal (*Cyprinus carpio* L. 1758) végeztük. A 800-1000 g tömegű halak a szegedi Tisza Fish Farm telephelyéről származtak, amelyeket a kezelések előtt 400 l-es jól levegőztetett tartályokban akklimatizáltunk, 2-3 hétig 15-16°C-on. A tartályok vizét hetente cseréltük. A kezelésekhez a halakat 100 l-es akváriumokba helyeztük át (2 hal/akvárium). A kezelések minden mintavételi időpontjában három vagy öt egyedet használtuk fel a mérésekhez. A kezelésekhez használt fémkoncentrációt fémionra vonatkoztatva adjuk meg. Ez mind a  $\text{Cd}^{2+}$  ( $\text{Cd}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , Fluka), mind az  $\text{As}^{5+}$  ( $\text{Na}_2\text{HAsO}_4$ , Fluka) esetében 1 és 10 mg/l végkoncentrációt jelent. A mintavétel 0, 6, 24, 48 és 72 óra elteltével történt. A szerveket és szöveteket azonnal lefagyasztottuk folyékony nitrogénben, majd  $-80^\circ\text{C}$ -on tároltuk a felhasználásig.

#### *Krónikus diabéteszes patkánymodell előállítás*

Dolgozatom másik részét képező diabéteszes kísérlethez 300-400 g tömegű, fiatal felnőtt (8 hetes), hím Wistar patkányokat használtunk. Az állatokat random módon kontroll (n=6), STZ-indukált kezeletlen diabéteszes (n=14) és inzulin-kezelt diabéteszes (n=12) csoportra osztottuk. A hiperglikémiát egyszeri, intraperitoneális STZ-injekcióval (Sigma) indukáltuk. A STZ-t fiziológiás sóoldatban feloldva, 60 mg/testtömeg kg-os dózisban alkalmaztuk [87]. 48 óra elteltével a farokvénából vért vettünk, melyből vércukor koncentrációt mértünk (Accu-Chek<sup>®</sup> Active vércukormérő). A kísérleti állatokat akkor tekintettük cukorbetegnek, ha a vércukor-koncentrációjuk 18 mmol/l fölé emelkedett.

A hiperglikémiás patkányok egy csoportjánál azonnali inzulin-kezelést kezdtünk el. Az állatok az inzulint (Humulin M3, Eli Lilly) szubkután injekció formájában naponta két dózisban (4 IU délelőtt és 2 IU délután) kapták. A kezeletlen diabéteszes és a kontroll állatcsoportok azonos mennyiségű fiziológiás sóoldatot kaptak szintén szubkután formában. A patkányok vércukorszintjét a 10 hetes kísérleti periódus során

hetente mértük és ellenőriztük. Az állatok a tápot és a vizet a kísérletek teljes ideje alatt tetszés szerinti mennyiségben fogyaszthatták.

Tíz héttel a diabétesz kiváltása után cervikális diszlokációt követően az állatok hasüregét U-alakban feltártuk, a bélesatornát teljes hosszában kiboncoltuk, majd foszfát pufferral (0,05 M, pH 7.4) átmostuk. Ezt követően a vékonybél proximális (duodenum; a pylorustól 1 cm-re disztálisan), valamint a vastagbél középső területéről 100-200 mg tömegű mintákat vettünk, melyeket folyékony nitrogénben lefagyasztottuk és a felhasználásig  $-80^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk.

## 2. Molekuláris biológiai vizsgálati módszerek

### *RNS preparálás fagyasztott mintákból*

A fagyasztott szövetekből/szervekből: ponty vese, máj, izom, bőr, kopoltyú, lép és vér mintákból ~100 mg-ot, a teljes szív és agy mintákat, valamint a patkányból származó különböző bélszakaszokat RNA Bee oldatban (Tel-Test Inc.) elhomogenizáltuk (2 perc, 1500 rpm) és a gyártótól származó instrukciókat követve össz-RNS-t preparáltunk. A homogenizátumokat 2-3-szor kloroformmal extraháltuk és centrifugáltuk (15 perc, 13500 rpm,  $4^{\circ}\text{C}$ ), majd a vizes fázisból 0,75 térfogatnyi jéghideg izo-propanollal denaturáltuk az RNS-t. A csapadékot centrifugálással gyűjtöttük össze (5 perc, 15000 rpm,  $4^{\circ}\text{C}$ ), 75%-os etil-alkoholban mostuk ( $-20^{\circ}\text{C}$ , éjszakán át), majd DEPC-vel (diethyl-pirokarbonát) kezelt desztillált vízben oldottuk fel. Annak érdekében, hogy az enzimatis reakciókhoz kellő tisztaságú RNS-t kapjunk, újra kicsaptuk 1/20 térfogatnyi Na-acetát és 2,5 térfogatnyi 96%-os etil-alkohol hozzáadásával. A csapadékot 75%-os etil-alkohollal mostuk ( $-20^{\circ}\text{C}$ , éjszakán át), majd feloldottuk DEPC-vel kezelt desztillált vízben. A tisztított RNS mintákat 100 U RNáz mentes DNáz I-vel kezeltük rutinszerűen (2 óra,  $37^{\circ}\text{C}$ ), hogy elkerüljük a DNS kontaminációt.

Az RNS koncentráció meghatározásához az OD  $A_{260} = 40 \mu\text{g/ml}$  RNS összefüggést alkalmaztuk (NanoDrop-1000 Spectrophotometer). Akkor tekintettük a mintát megfelelő tisztaságúnak, ha az  $A_{260}/A_{280}$  arány 1,8-nál nagyobb volt.

***Reverz transzkripció (RT) és polimeráz lánreakció (PCR)***

A cDNS szintézis 5 µg totál RNS-ből kiindulva 20 µl végtérfogatban történt. A templát RNS-t 500 pmol random hexamer primer jelenlétében 90°C-on denaturáltuk, majd 200 U Maxima H Minus reverz transzkriptáz, 200 pmol dNTP keverék és 1 x RT reakció puffer elegyében 10 percig 37°C-on, ezt követően 60 percig 52°C-on inkubáltuk, majd -20°C-on tároltuk.

***RT-PCR amplifikáció***

A PCR amplifikálásokhoz templátként az RT reakció termékekből 1 µl-t használtunk fel reakciónként 25 µl 2 x DreamTaq Green PCR Master Mix-ben. Az amplifikációt PTC 200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research) készülékkel végeztük. Az amplifikáció ciklusszámát előkísérletek során határoztuk meg. Az *annealing* hőmérséklet és az egyes ciklusok száma az adott primer pár függvénye volt, a szintézis lépésének idejét pedig az amplifikált termék várható hossza határozta meg. Minden csoport esetében három-öt független párhuzamos mintát használtunk. Az RT-PCR reakciót minden minta esetén háromszor ismételtük, hogy növeljük a mérések megbízhatóságát.

A halakból és patkányokból származó mRNS mennyiségi meghatározásához reverz transzkripció-kapcsolt PCR-amplifikációt (RT-PCR) végeztünk: 1 perc 95°C-on, denaturálás 30 másodperc 95°C-on, *annealing* 30 másodperc 55-63°C-on, szintézis 50 másodperc 72°C-on. Az mRNS szinteket *β-aktin* mRNS mennyiségére normalizáltuk [78].

***qRT-PCR amplifikáció***

Eredményeink megerősítéséhez valós idejű (Real-Time) qPCR-t végeztük a diabéteszes kísérletekre vonatkozóan. Az amplifikálásokhoz templátként az RT reakció termékekből 1 µl-t használtunk fel reakciónként 25 µl Luminaris Color HiGreen Low ROX qPCR Master Mix-ben. Az Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (Life Technologies) készülék programja segítségével 40 ciklus során a következő reakció ment végbe: 10 perc 95°C-on, denaturálás 15 másodperc 95°C-on, *annealing* 60 másodperc 63°C-on, szintézis 60 másodperc 72°C-on, olvadási görbe szerkesztése 60-

95°C között. A vizsgált mRNS mennyiségét a  $\beta$ -aktin génre normalizáltuk, és a számításokat  $\Delta\Delta C_t$  módszer [112] alapján végeztük.

### **Primerek**

A ponty-specifikus *ho* cDNS amplifikálásához használt primereket zebra-dánió (*Danio rerio* Hamilton 1822) (NM\_001127516; NM\_001103139), aranyhal (*Carassius auratus* L. 1758) [216], nílusi sügér (*Oreochromis niloticus* L. 1758) (XM\_003449966) és fugu (*Takifugu rubripes*) (XP\_003972631; XP\_003964694) *ho* szekvenciái alapján terveztük meg.

1. táblázat	Hal-specifikus primerek
Primerek	5' →3'
HO1F	CGCTGCTCATCCCGCAGTTCA
HO2F	CAAGGTTTCATCCTGATCTGGC
HOR	CGGGTGTAAGCGTGGGCCAC
HO1F2	ATGGAATCCACGAAAAGCAAA
HO1R	ACTCCCATGCCAACCGTDGC
HO2R	TCACATAAGGTACCAAGCAG

A patkány cDNS amplifikálásához, a gén-specifikus primereket a *ho-1* (NM\_012580), a *ho-2* (NM\_024387), az *mt-1* (M11794), az *mt-2* (AY341880), a *kaspáz-9* (NM\_031632), a *bax* (RRU49729), a *bcl-2* (NM\_016993) és a  $\beta$ -aktin (M24113) Genbank-ban elhelyezett szekvenciák alapján terveztünk.

### **Géldokumentáció, denzitometráls**

A ponty-specifikus *ho* gének azonosítása során az amplifikált termékeket 0,8% agaróz gélen (SeaKem LE) futtattuk, majd Ultrafree-MC Centrifugális szűrők (Millipore) segítségével izoláltuk a gélből, és PCR-termékpulációt szekvenáltattuk.

A génexpresszió során amplifikált PCR termékeket 2%-os agaróz gélen (Sigma, USA) futtattuk meg. Az ethidium-bromiddal festett géleket UVP High Performance UV Transilluminator GDS 7500 típusú gél dokumentációs rendszerrel digitalizáltuk és a GelBase/GelBlot<sup>TM</sup> Pro Gel Analysis szoftver (Ultra Violet Products Ltd.) segítségével kiértékeljük. Az mRNS-ek relatív szintjét a belső kontrollként használt  $\beta$ -aktin-ra vonatkoztatott arányszámként (vizsgált gén/  $\beta$ -aktin x 100) fejeztük ki.

2. táblázat Primer szekvenciák és amplifikációs ciklus számok		
Gének	Primerek (5'→3')	Amplifikációs ciklusok
<i>ho-1</i>	GCTGCTGGTGGCCCACGCTT ACAGTCCAATGTTGAGCAGG	30
<i>ho-2</i>	GCTGCTGGTGGCCCACGCTT AGGGTTTCTTTTGTAGCATGGA	30
<i>mt-1</i>	ATGGACCCCAACTGCTCCTG TGGAGGTGTACGGCAAGACT	25
<i>mt-2</i>	ATGGACCCCAACTGCTCCTG GAAAAAAGTGTGGAGAACCG	25
<i>kaspáz-9</i>	AGCCAGATGCTGTCCCATAC CAGGAACCGCTCTTCTTGTC	32
<i>bax</i>	GGAGGCGGCGGGCCCACCAG CACGTCAGCAATCATCCTCTGC	30
<i>bcl-2</i>	GGAAGGATGGCGCAAGCCGG CGCAGGCCAGCGTTGGCGAC	30
<i>β-aktin</i>	GCAAGAGAGGTATCCTGACC CCCTCGTAGATGGGCACAGT	23

### ***Filogenetikai analízis***

A hemoxigenázok filogenetikai analízise során különböző gerincesek már ismert HO aminosav szekvenciáit hasonlítottunk össze a Phylogeny szoftver csomagot [52] alkalmazva. *Homo sapiens* NP\_002124.1 és NP\_002125.3; *Macaca mulatta* XP\_001113241.2 és NP\_001252998.1; *Tursiops truncatus* XP\_004315933.1 és XP\_004310399.1; *Mus musculus* NP\_034572.1 és NP\_001129538.1; *Rattus norvegicus* NP\_036712.1 és NP\_077363.1; *Gallus gallus* NP\_990675.1 és XP\_004945440.1; *Bos taurus* NP\_001014912.1 és XP\_005224478.1; *Xenopus tropicalis* XP\_002934766.1 és NP\_001072640.1; *Anolis carolinensis* XP\_003220978.1; *Crotalus horridus* JAA96881.1; *Latimeria chalumnae* XP\_006006976.1 és XP\_006001510.1; *Alligator sinensis* XP\_006026050.1 és XP\_006034310.1; *Chrysemys picta bellii* XP\_005300880.1 és XP\_005312205.1; *Danio rerio* NP\_001120988.1 és NP\_001096609.1; *Xiphophorus maculatus* XP\_005797578.1 és XP\_005806580.1; *Takifugu rubripes* XP\_003972631.1 és XP\_003964694.1; *Oryzias latipes* XP\_004065741.1 és XP\_004066399.1; *Oreochromis niloticus* XP\_003443134.1 és XP\_005454959.1; *Carassius auratus* [216].



### 3. Biokémiai mérési módszerek

#### *Fehérjék kvantitatív meghatározása*

A fehérjetartalom meghatározásához a mintáinkból fiziológias sóoldattal (0,62% ponty és 0,9% patkány esetében) ötszörös hígításban homogenizátumot készítettünk, majd centrifugáltuk (10 perc, 10000 rpm). Mind a homogenizátumból, mind pedig a lecentrifugált felülúszóból meghatároztuk a fehérjetartalmat Lowry és munkatársai [116] módszere szerint. 100 µl mintához 1 ml „C” oldatot adtunk. A „C” oldat 20 g/l Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0,2 g/l K-Na-tartarát és 0,1 M NaOH összetételű „A” oldat és 5 g/l koncentrációjú CuSO<sub>4</sub> x 5 H<sub>2</sub>O („B”) oldat 50:1 arányú elegye. 10 perc elteltével a reakcióelegyhez 100 µl kétszeresére hígított Folin-Ciocalteu-reagenst adtunk. Újabb 30 perc elteltével 750 nm-en spektrofotometráltuk. Borjú szérum albuminból (BSA) készített kalibrációs görbe segítségével határoztuk meg a fehérjetartalmat.

#### *A GSH koncentráció meghatározása*

Lecentrifugált homogenizátumok felülúszójából határoztuk meg a GSH mennyiségét Sedlak és Lindsay [182] módszerét alkalmazva. A mérés a mintákban található fehérjék négyszeres mennyiségű 5% TCA-val való denaturálását, majd centrifugálását (10 perc, 10000 rpm) követően a felülúszókból történt. Ezzel a lépéssel a fehérje –SH csoportok hatása minimalizálható volt. A reakcióban szulfhidril-reagensként 10 mM DTNB-t (5,5'-ditiobis-(2-nitro-benzoészav) metanolban oldva alkalmaztunk, mely sárga színű komplexet képez a reaktív nem fehérje –SH csoportokkal. A GSH koncentráció a komplex fényelnyelésének 412 nm-es hullámhosszon történő abszorbancia mérésével meghatározható. A komplex képződéséhez szükséges lúgos közeg beállítása (pH 8.0-8.2) 0,4M TRIS (tris-(hidroximetil)-aminometán) pufferrel (pH 8.9) történt.

$$[\text{GSH}] = \frac{E \times V_{\text{össz}} \times \text{hígítás} \times 10^{-3}}{\varepsilon \times l \times V_{\text{minta}}}$$

E: extinkció, ε: moláris extinkciós koefficiens (131000 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>), V<sub>össz</sub>: mérőelegy térfogata (ml), V<sub>minta</sub>: minta térfogata (ml), l: fényút hossza (cm)

### ***A GSSG koncentráció meghatározása***

Lecentrifugált homogenizátumok felülúszójából határoztuk meg a GSSG tartalmat Tietze módszerét alkalmazva [200]. A módszer lényege, hogy a reakcióelegybe feleslegben adunk GR enzimet valamint NADPH-t, így a mintában jelenlévő GSSG GSH-vá redukálódik. A kísérlet kontroll eredményeit Sedlak módszerével kaptuk (ld. GSH koncentráció meghatározás), és a két eredmény különbségéből következtettünk a GSSG mennyiségére. A kísérletek során 250 µl felülúszót inkubáltunk 240 µl 0,05 M TRIS pufferben (pH 8.9), 5 µl (250 U) GR enzimmal és 5 µl 100 µM NADPH-val (30 perc). Ezután az össz-GSH meghatározást Sedlak módszere szerint végeztünk.

$$[\text{GSSG}] = \frac{\text{össz}[\text{GSH}](\text{Tietze}) - [\text{GSH}](\text{Sedlak})}{2}$$

2

### ***A LP mérése***

A méréseket Placer és munkatársai [165] által kidolgozott, majd Novák és munkatársai [152] által módosított módszer alapján végeztük el homogenizátumból. A többszörösen telítetlen zsírsavak oxidatív lebomlásakor keletkező malondialdehid (MDA) savas közegben, magas hőmérsékleten tiobarbitursavval sárgás-vörös színű komplexet, trimetint képez, melynek abszorpciós maximuma 532 nm hullámhosszon van. A homogenizátumhoz tízszeres mennyiségű reagenst (15% TCA; 0,375% tiobarbitursav; 0,25 N HCl) adtunk, majd a reakció elegyet forró vízfürdőben tartottuk (15 perc). Ezt követően jégben lehűtöttük, majd centrifugáltuk (10 perc, 10000 rpm, 4°C). A felülúszót 532 nm-en fotometráltuk. Vak oldatként desztillált vizet használtunk a reagensben homogenizátum helyett. Az MDA koncentráció számítása:

$$[\text{MDA}] = \frac{E \times V_{\text{össz}} \times 10^{-2}}{\epsilon \times l \times V_{\text{minta}}}$$

E: extinkció,  $\epsilon$ : moláris extinkciós koefficiens ( $152000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ),  $V_{\text{össz}}$ : mérőelegy térfogata (ml),  $V_{\text{minta}}$ : minta térfogata (ml), l: fényút hossza (cm)

### ***A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> koncentráció meghatározása***

A minták H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> koncentrációját Villegas és Gilliland [210] metodikája segítségével határoztuk meg a lecentrifugált felülúszóból. Peroxidázok katalizálják számos festék, mint az *o*-dianizidin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> általi oxidációját. A színes pigment mennyisége kolorimetriásan mérhető. A foszfát pufferben (0.05 M (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 6.0) hígított mintákat (máj 50x, vese 20x híg) HRP enzim (0.05 mg/ml koncentrációban, Horseradish Type VI-A) oldatával és *o*-dianizidin oldattal (0,1 mg/ml, metanolban oldva) elegyítettük, majd inkubáltuk (10 perc, 37°C, sötétben), és sósavval (4 N HCl) leállítottuk a reakciót. Kontrollként a mintát pufferrel helyettesítettük. A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mennyiségét fotometrállással 400 nm-en, foszfát pufferben hígított H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kalibrációs egyenese alapján határoztuk meg.

### ***A ONOO<sup>-</sup> koncentráció meghatározása***

A ONOO<sup>-</sup> jellemző tulajdonsága, hogy magas pH értéken stabil, neutrális pH értéken pedig gyorsan bomlik [71]. 60:1 arányban 1 M NaOH-dal elegyítettük a felülúszóból származó mintákat, és 302 nm-en követtük az extinkció változását 3 percen át. Kontrollként ugyanebben az arányban 0,1 M kálium-foszfát (K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) pufferrel elegyítettük a mintákat (pH 7.4), és 3 percen át követtük az extinkció csökkenését.

$$[\text{ONOO}^-] = \frac{\Delta E \times V_{\text{össz}} \times 10^{-4}}{\varepsilon \times l \times V_{\text{minta}}}$$

E: extinkció,  $\varepsilon$ : a termék moláris extinkciós koefficiense (1670 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>), V<sub>össz</sub>: mérőelegy térfogata (ml), V<sub>minta</sub>: minta térfogata (ml), l: fényút hossza (cm)

### ***SOD aktivitás meghatározása***

Az összSOD aktivitását Misra és Fridovich [138] módszere alapján határoztuk meg. A metodika lényege, hogy a SOD koncentrációjától függően gátolja az adrenalin-adrenokróom átalakulást. A reakcióelegy 0,05 M karbonát puffert (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, EDTA, pH 10.2, 37°C -os vízfürdő), a lecentrifugált homogenizátumok felülúszóját, valamint adrenalint (16,488 mg 10 ml 0,01 N HCl-ben oldva) tartalmazott, melyet 480 nm-en fotometriásan mértünk 4 percig. A kapott extinkció-változások segítségével számoltuk az adrenalin-adrenokróom spontán átalakulás gátlásának mértékét (gátlás%), és 1 enzim egységet (U) az adrenokróom-képzés 50%-os gátlásaként értelmeztük. Ezt az

összfehérje-tartalomra vonatkoztattuk, és az enzimaktivitás eredményeit U/mg fehérje formában adtuk meg.

### ***KAT aktivitás meghatározása***

Beers és Sizer [21] módszere alapján 0,05 M foszfát puffer ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7.0) és 30 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ , valamint a lecentrifugált felülúszót tartalmazó minta felhasználásával végeztük. A KAT hatására végbemenő  $\text{H}_2\text{O}_2$  bomlást, 25°C-on, spektrofotometriásan 240 nm-en követtük nyomon. Egy Bergmeyer enzimegységként (BU) definiáltuk a KAT enzim azon mennyiségét, amely 25°C-on 1 perc alatt 1 g  $\text{H}_2\text{O}_2$ -t képes elbontani.

$$\text{Számolás: } \frac{\Delta E \times V_{\text{össz}} \times \text{hígítás}}{\varepsilon \times V_{\text{minta}}}$$

E: extinkció,  $\varepsilon$ : a termék moláris extinkciós koefficiense ( $43,6 \text{ cm}^2/\text{mol}$ ),  $V_{\text{össz}}$ : mérőelegy térfogata (ml),  $V_{\text{minta}}$ : minta térfogata (ml)

### ***A szövetek nehézfém-tartalmának meghatározása***

A kísérleti egyedekből származó máj és a vese szövetek (3 g) szárítását követően egyesével 10 tömeg/térfogat arányban tömény salétromsavban (69,2%-os  $\text{HNO}_3$ ) (80°C, 3 óra) történt az emésztés. A homogenizátumok Cd és As tartalmának meghatározása láng vagy grafit kemence porlasztást követően a fém koncentrációjától függően Hitachi Z8200 Zeeman polarizált atomabszorpciós spektrofotométerrel történt. A Cd és As tartalmat  $\mu\text{g/g}$  száraz tömegben adtuk meg.

## **4. Hisztológiai vizsgálati módszerek**

### ***Bélminták előkészítése transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz***

Az elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz 2-3 mm széles béldarabokat 2%-os paraformaldehid és 2%-os glutáraldehid oldatában (0,05 M foszfát pufferben oldva) fixáltunk (4°C; éjszakán át). Ezt követően a mintákat foszfát pufferben (0,05 M; pH 7.4) mostuk. A különböző bélszakaszokból származó mintákat fixálás és mosás után 1%-os ozmium-tetroxid ( $\text{OsO}_4$ ) oldatban (0,1 M foszfát pufferrel) utófixáltuk (60 perc). A mintákat foszfát pufferben mostuk (0,1 M; pH 7.4), majd felszálló alkoholsorozatban dehidráltuk. Az 50%-os, majd 70%-os alkohollal való kezelés után a mintákat uranil-

acetáttal telített 70%-os etanolba tettük (5 perc), majd a 96%-os etanolban, abszolút alkoholban és acetonban folytattuk a dehidrációt. Ezt követően a mintákat aceton intermédiumon át Epon gyantába ágyasztuk, majd a gyantát polimerizáltattuk (60°C).

Minden bélszakaszból és kísérleti csoportból négy mintát ágyasztunk be, majd a blokkokból először félvékony metszeteket (0,7  $\mu\text{m}$ ), majd Reichert típusú ultramikrotómmal ultravékony (70 nm) metszeteket készítettünk, melyeket Formvar-kezelt hártás nikkel-rostélyokra helyeztünk (3 rostély/blokk).

### ***Posztembedding immunhisztokémiai vizsgálatok***

A HO-2 és a kaszpáz-9 kvantitatív meghatározásához, az ultravékony metszeteken posztembedding immunhisztokémiai festéseket végeztünk mindkét bélszakaszban. Az immunreakció egyes lépéseit humid légkörű Petri-csészében, parafilmre helyezett cseppeken végeztük.

A nikkel-rostélyokra helyezett metszeteket először 1%-os perjódosavban (9 perc), majd desztillált vízzel történő mosás után 2%-os Na-perjodátban (10 perc) inkubáltuk. Ismételt alapos mosást követően a metszeteket TRIS-pufferes sóoldat (TBS)-cseppekre (pH 7.4) helyeztük (3x2 perc), majd inkubáltuk (30 percet) 1%-os BSA oldatban [0,05 g BSA, 5 ml TBS (pH 7.4)]. Desztillált vizes mosás, majd újbóli TBS-kezelés után (2x3 perc) a rostélyokat az elsődleges ellenanyaggal inkubáltuk (szobahőmérséklet, éjszakán át). Elsődleges ellenanyagként a HO-2 egér monoklonális IgG-t (Santa Cruz Biotechnology, USA) 1:50 hígításban és a kaszpáz-9 nyúl poliklonális IgG-t (Sigma-Aldrich, USA) szintén 1:50 hígításban alkalmaztuk. Az elsődleges antitestet minden esetben 1%-os BSA-val hígítottuk. Ezután a metszeteket ismét TBS-cseppekre (2x10 perc) helyeztük, majd BSA-TRIS puffer oldatában inkubáltuk tovább (0,05 g BSA, 25  $\mu\text{l}$  Tween-20, 5 ml TRIS (pH 7.6); 2x5 perc). Ezt követően a rostélyokat a másodlagos ellenanyaggal [protein A-arany-conjugált anti-egér és anti-nyúl (18 nm arany szemcse, Jackson ImmunoResearch)] 1:20 hígításban alkalmazva inkubáltuk (3 óra, szobahőmérséklet). A másodlagos antitesteket BSA-TRIS puffer oldatával hígítottuk ki. Az immunfestés végén a rostélyokat desztillált vízben alaposan mostuk, majd szűrőpapírral óvatosan leitattuk.

Az immunreakció specifikitását minden esetben ellenőriztük. Ehhez a metszeteket az elsődleges antitest elhagyásával, csak az aranykolloidot tartalmazó másodlagos antitestben inkubáltuk.

A folyamat során az elsődleges és a másodlagos szérumon kívül minden felhasznált oldatot átszűrtünk (0,22  $\mu\text{m}$ -es pórusméretű Millex GP filter, Sigma-Aldrich), hogy kivédjük az esetleges mikroszennyezéseket. A kontrasztfestés Reynolds-féle módszerrel [173] történt. A mintákat 20 percre uranil-acetát oldatcseppre helyeztük, majd desztillált vízzel mostuk, ezután 3 percre ólom-citrát oldatba tettük és ismét mostuk. Az ultravékony metszeteket MEGAVIEW II kamerával felszerelt Philips CM 10 típusú elektronmikroszkóppal vizsgáltuk.

Bélszakaszonként és kísérleti csoportonként 46000x-es nagyításon digitális képeket készítettünk. A festődés intenzitását, vagyis az egységnyi területére eső aranyzemcsék mennyiségét mindkét vizsgált fehérje esetében az AnalySIS 3.2 program segítségével számoltuk.

## 5. Statisztikai analízis

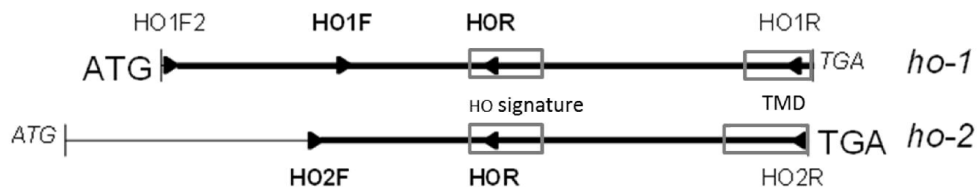
A biokémiai, a molekuláris biológiai, valamint az immunhisztokémiai vizsgálatok során nyert adatokat statisztikai analízisnek vetettük alá. Egyfaktoros varianciaanalízist (ANOVA) és Newman-Keuls tesztet végeztünk (GraphPad Prism 4.0 és MedCalc Statistical Software 9.4.2.0). A kapott eredményeket diagramokon ábráztuk, az értékeket átlag $\pm$ SD formában tüntettük fel. A szignifikancia szintjét \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , illetve \*\*\* $p < 0,001$  valószínűségi értékben határoztuk meg.

## V. EREDMÉNYEK

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

#### 1. A ponty *ho* gének azonosítása

A *ho* géneket csupán néhány halfajban azonosították eddig. Pontyban ezek a gének még nem voltak ismertek, ezért első feladatunk az azonosításuk és a jellemzésük volt. A ponty-specifikus *ho* transzkriptumok azonosításához RT-PCR-t végeztünk kezeletlen és Cd-kezelt állatok májából származó totál RNS-t használva templátként azért, hogy a család konstitutív és indukálható tagja egyaránt reprezentálva legyen az mRNS populációkban. A PCR primerek tervezéséhez a Genbank-ban elhelyezett hal *ho* szekvenciákat használtuk fel (*Danio rerio*, *Carassius auratus*, *Oreochromis niloticus* és *Takifugu rubripes*). A szekvencia összehasonlítások során eltéréseket kerestünk a *ho-1* és *ho-2* szekvenciák között, amelyek alapján génspecifikus primer párokat [HO1F2/HO1R (1-20/795-817 bp) és HO2F/HO2R (288-309/909-929 bp)] terveztünk, melyek a kódoló szekvenciák 5' és 3' végén helyezkednek el (8. ábra).



**8. ábra.** A ponty *ho-1* és *ho-2* gének kódoló régióinak sematikus rajza. Az egyenes vonalak jelzik a két *ho* gén kódoló szakaszát, ami magába foglalja a start és stop kodont. A vastag vonalak az általunk azonosított szekvenciákat jelzik. A szürke keretek a „*HO signature*” motívumokat és a transzmembrán domént (TMD) kódoló szekvenciákat jelölik. A nyilak mutatják a primerek pozícióját és orientációját. A HO1F2/HO1R, és HO2F/HO2R primer párokat a gének azonosításához alkalmaztuk. A HO1F/HOR és HO2F/HOR primer párt a mintáink *ho* mRNS szintjének meghatározásához használtuk.

A HO1F2/HO1R primer pár segítségével egy 819 bp hosszú PCR-terméket amplifikáltunk, amelynek szekvenciája a legnagyobb, 92%-os homológiát az aranyhal *ho-1* génnel mutatta. Az amplifikáció a HO2F/HO2R primer párral egy 642 bp DNS-fragmentet eredményezett, ami ~70%-át teszi ki a zebradánió *ho-2* génjét kódoló régióknak, amellyel 81%-os homológiát mutat. A ponty *ho-1* és *ho-2* szekvenciák nagyfokú homológiát mutattak a többi ismert halfaj *ho* génjeivel is, így azok a ponty *ho*-k ortológjainak tekinthetők. A ponty *ho* paralógok összehasonlítása jóval kisebb hasonlóságot (48%) eredményezett. Mindkét cDNS teljes hosszán át húzódik egy nyitott leolvasási keret. Az ebből levezetett ponty HO-1 aminosav szekvenciája 92%-ban volt azonos az aranyhal HO-1 fehérjével (9. ábra). Szekvencia analízis eredményei alapján az emlős HO-1-hez hasonlóan a ponty HO-1 is hordozza a transzmembrán domént (250-271 aminosav közötti régió), továbbá a HO domént (14-218 aminosav közötti régió), és az ezen belül található „HO signature” motívumot (129-152 aminosav közötti régió). Összességében a HO-1 ortológok 45-92%-ban azonosak madarakban, emlősökben és a halakban. Ezek HO doménje 53-88%-os azonosságot mutat, ugyanakkor a „HO signature” motívum 83-100%-ban azonos.

```

C. carpio      MESTKSKPRDSTGSDLSEQIKAVTKDSHVRAENTQLMLSYQKGQITPTQYKLLLCSLYEI 60
C. auratus     MESTKSKPRDSTGSDLSEQIKAATKDSHVRAENTQLMLNYQKGQITQTQYKLLLCSLYEI 60
                *****
                *****

C. carpio      YQALEEELDRNAAHPAVQPIYFPQELARLESLELDLEHFFGPHWRKRVTVPAATHRYTQR 120
C. auratus     YRALEEELDRNADHPAVQPVYFPQELARLESLELDLEHFFGPHWRKRVTVPAATHRYTQR 120
                * *****

C. carpio      LREIGKNSPDLVAHAYTRYLGDLSGGQVLGKITQKSLGSLGNGKILFFSFPGVSSPNRF 180
C. auratus     LREIGKNSPDLVAHAYTRYLGDLSGGQVLGKITQKSLGSLGKGTAFFSFPGVTSPNKF 180
                *****

C. carpio      KQLYRSRMNSIELTEQQRQEVLDATRAFEFNI PVFDDLQKMLSITEEASSEKGNDAASK 240
C. auratus     KQLYRGRMNSIELTEQQRQEVLDATRAFEFNI EVFDDLQKMLSITEEASSEKRNDTASQ 240
                *****

C. carpio      TSKTFSSSPVLQFALGVGITLATVGMGVYAF 272
C. auratus     SQRTFSNSPILQFALGVGITLATVGMGVYAF 272
                * * * * *

```

**9. ábra.** A ponty (*C. carpio*) HO-1 aminosav szekvencia összehasonlítása az aranyhaléval (*C. auratus*). A konzervált aminosavakat \*-gal, a „HO signature” motívumokat feketével és a transzmembrán doméneket szürkével jelöltük. Az összehasonlításokat a ClustalW2 program segítségével végeztük.



A ponty HO-2 protein is hordozza a „*HO signature*” motívumot (10. ábra). A ponty HO-1 és HO-2 fehérjék aminosav szekvenciája 31%-os egyezést mutat. A leginkább konzervált motívum, a „*HO signature*” szekvenciája 87%-ban egyezik meg. Az emlős HO-2 fehérje szekvenciában három cisztein-tartalmú HRM-ot találunk, melyekből kettő a C-terminális szakaszon a környezet redox állapotától függően hemet köt. A három HRM-ből kettőt a ponty HO-2 szekvenciájában is felfedeztünk, mindkettő a C-terminális végen található.

```

C. carpio    HELHRRDALARDLQYFYGEDWQDQVRVSPATQRYVERTQQIGRDEPALLVAHAYTRYMGD 60
D. rerio    HELHRRDALAQDLQFFYGSWQTQISISPATQRYVQRIHQIGKDEPALLVAHAYTRYMGD 60
*****    ***  ***  ***  *   *****  **  ***  *****

C. carpio    LSGGQVLRKVAQRAMKLPHTGEGLNFYEFDGIHSAKAFKQLYRSRMNELELDTHTKQKIV 120
D. rerio    LSGGQVLRKVAQRALKLPASGDGLNFYMFDNVSNKAFKQLYRSRMNELELQDPTKLVKIV 120
*****    *****  ***  *   *****  **   *****  ***  ***

C. carpio    EEAVLAFQFNMEIFGELEEVGKTLQDDVLDAAPAHGEMQGDISQCPYAAKTAASGGSSY 180
D. rerio    EEAVLAFQFNIEIFEEI GEVGQTLEDDVFDAAAPVHGEMQGDISQCPYHAAKMAASGGSSY 180
*****    ***  *   ***  **  ***  *****  *****  ***  *****

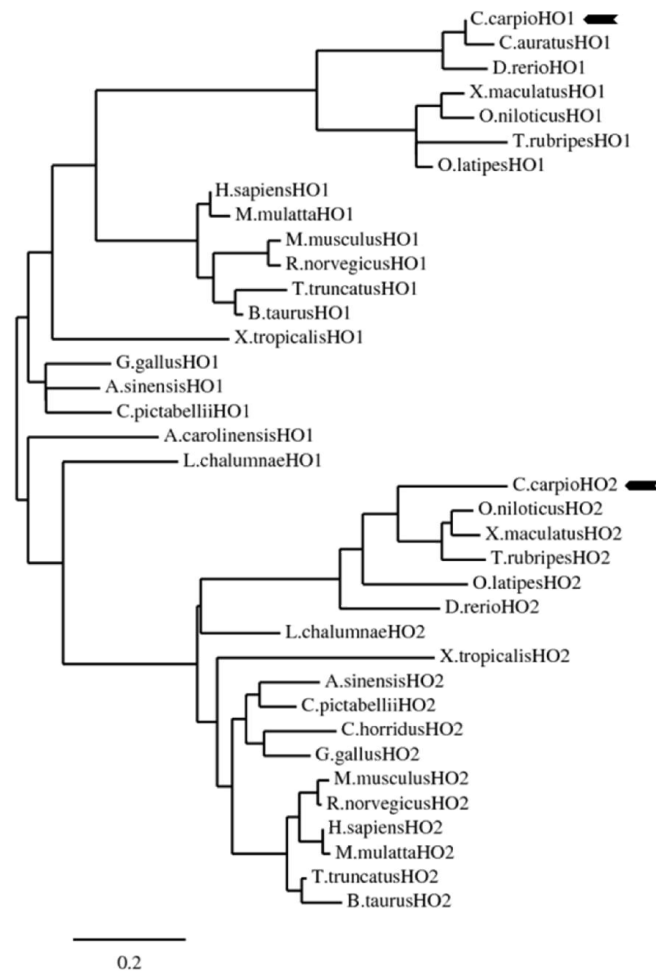
C. carpio    IQMAKTVLKNPSGQVLLAAWIAALAGLAAWYLM 214
D. rerio    VQIAKTVLKNPSGQVLLAAWIAALAGLAAWYLM 214
*****    **  *****

```

**10. ábra.** A ponty (*C. carpio*) HO-2 összehasonlítása a zebradánióval (*D. rerio*). A konzervált aminosavakat \*-gal, a „*HO signature*” motívumokat feketével, a hem-kötő motívumok konzervált pozícióban lévő ciszteinjeit pirossal és a transzmembrán doméneket szürkével jelöltük. Az összehasonlításokat a ClustalW2 program segítségével végeztük.

## 2. A hemoxigenázok filogenetikai analízise

Filogenetikai elemzést végeztünk a GenBank-ban megtalálható gerinces HO szekvenciákon, amely magában foglal minden jelenleg ismert halat, néhány kétéltűt, hüllőt, madarat és emlőst. Az elemzés alapján készült törzsfa jól tükrözi a szekvenciák közti hasonlóságokat és különbségeket. Az analízis eredményéből látszik, hogy a HO-1 és HO-2 két jól elkülöníthető csoportba tartozik, és ezeken belül a halak, a kétéltűek, a madarak, a hüllők és emlősök csoportja megkülönböztethető (11. ábra).

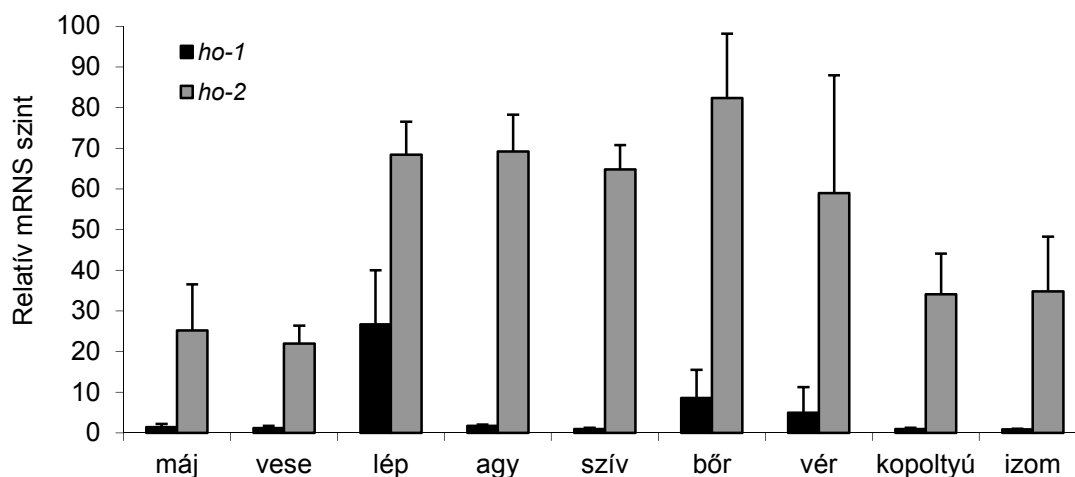


**11. ábra.** A HO-k filogenetikai törzsfája. A törzsfá a rokonsági kapcsolatokat ábrázolja a ponty HO-k és több ismert gerinces HO-1 és HO-2 között. A lépték (0.2) az evolúciós távolságot jelzi a fehérjeszekvenciák különbségei alapján. A ponty helyét a törzsfán nyíl jelöli. A gerincesek teljes HO szekvenciáihoz a GenBank adatbázisból jutottunk és ezek összehasonlítása a Phylogeny.fr program [52] segítségével történt.

### 3. A *ho* gének alap expressziója

Vizsgáltuk a két *ho* gén alap expresszióját a ponty különböző szöveteiben: májban, vesében, lépben, agyban, szívben, bőrben, vérben, izomban és kopolytúban. A PCR-amplifikációhoz ponty-specifikus primereket terveztünk: a *ho-1* és *ho-2* közös reverz primere (HOR) átfed a konzervált HO motívumot kódoló szekvenciával, míg a gén-specifikus *forward* primereket (HO1F és HO2F) a *ho* szekvenciák közötti lényeges eltérést mutató régiókra terveztük. A *ho-2* magas szinten expresszálódott az összes vizsgált szövetben. A legmagasabb expressziós szint a bőrben, a legalacsonyabb a vesében volt kimutatható. A *ho-1* mRNS mennyisége a kimutathatóság határán volt a

kezeletlen állatok vizsgált szöveteiben, a lép, a bőr és a vér kivételével. A legmagasabb *ho-1* mRNS mennyiséget a lépben mértük. Ez kapcsolatban állhat az immunválaszban és a vérellátásban betöltött funkciójával. A *ho-2/ho-1* arány lépben ~2.5. A vérben, ahol a *ho-1* gén expresszió jóval alacsonyabb, a *ho-2/ho-1* arány 13, a bőrben 8,5 volt (12. ábra).

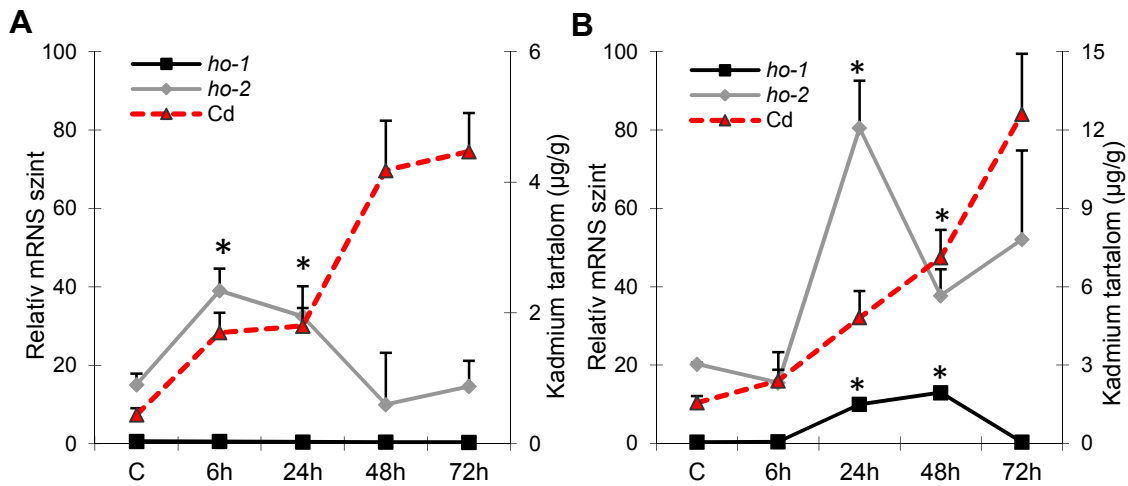


**12. ábra.** A *ho* gének expressziója kezeletlen ponty szövetekben. A grafikonon az mRNS szinteket a  $\beta$ -aktin-hoz viszonyítva ábrázoltuk. (n= 3-5)

#### 4. Nehézfém expozíció hatása a *ho* gének kifejeződésére

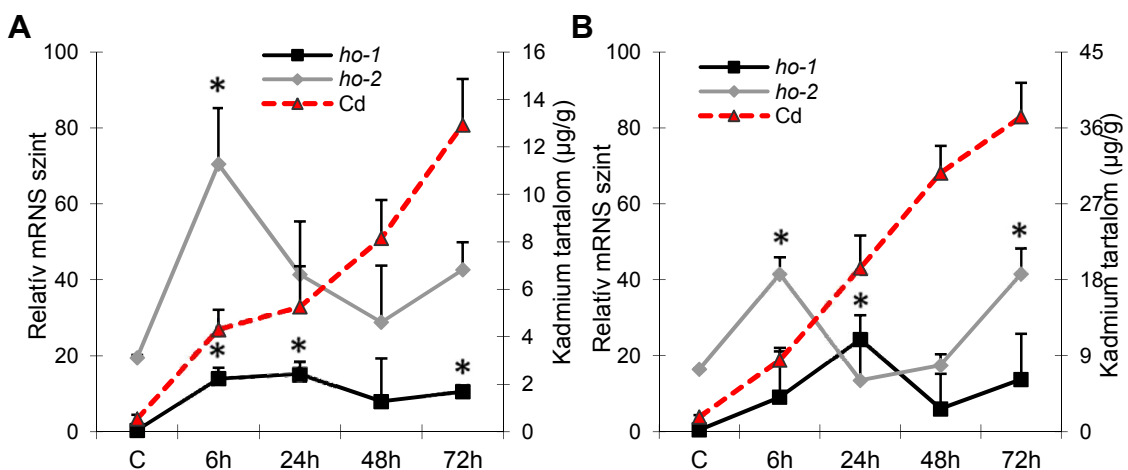
##### A Cd-kezelés hatása

A *ho* gének expresszióját a Cd expozíció koncentrációjával és időtartamával összefüggésben vizsgáltuk. Májban a Cd 1 mg/l koncentrációban alkalmazva nem indukálta a *ho-1* gén expresszióját, a *ho-1* mRNS mennyisége a kimutathatóság határán volt a kontroll állatokéhoz hasonlóan. Ugyanitt a *ho-2* gén 2,5-szer magasabb szinten fejeződött ki, mint a kezeletlen állatokban (13.A ábra). Vesében a *ho-1* gén 24 órás expozíciót követően indukálódott, expressziója 48 órás kezelés időpontjában volt a legmagasabb; körülbelül 13-szorosára emelkedett az mRNS mennyisége a kezeletlen állatok veséjében mért értékekhez képest. A *ho-2* gén szintén 24 órás expozíciót követően indukálódott, amely időpontban a kontroll értékeknél 4-szer magasabb mRNS mennyiséget mértünk (13.B ábra).



**13. ábra.** A *ho-1* és *ho-2* gének expressziójának időbeli lefolyása és a Cd felhalmozódása a májban (A) és a vesében (B) 6-72 órás 1 mg/l Cd kezelést követően. A grafikonon az mRNS szinteket a  $\beta$ -aktin-hoz viszonyítva ábrázoltuk. Átlag  $\pm$  SD. \* $p < 0,05$  (kontrollhoz viszonyítva)

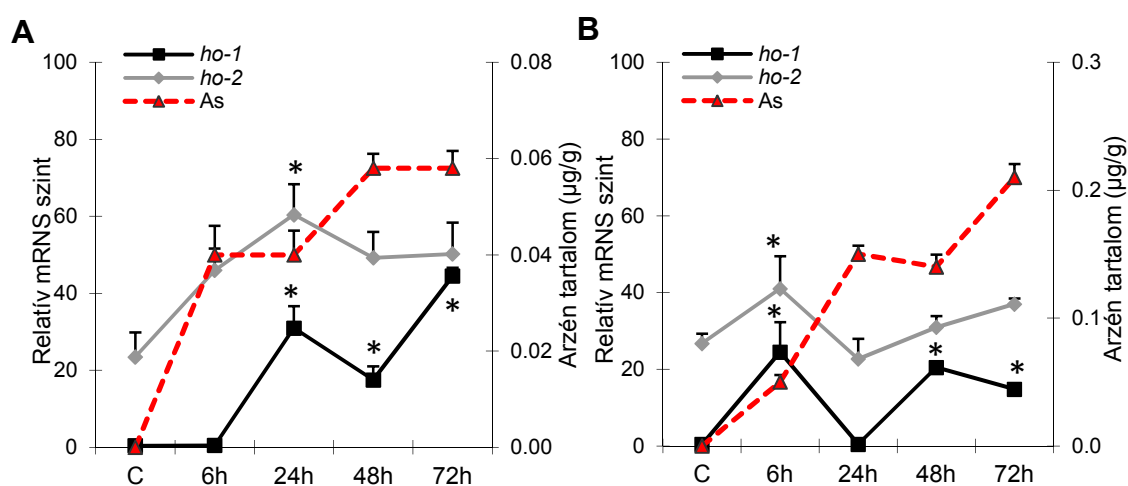
A Cd 10 mg/l-es koncentrációban alkalmazva átmenetileg mindkét *ho* gén expresszióját indukálta. Májban a *ho-1* mRNS 6 és 72 órás expozíciós idő között folyamatosan kimutatható volt, többé-kevésbé egyenletes mértékű, az alap expressziós értékhez képest 15-szörös emelkedést tapasztaltunk (14.A ábra). Vesében is indukcióról beszélhetünk a *ho-1* gén expresszió tekintetében, 24 órás kezelést követően mértük a legnagyobb mRNS mennyiséget. A *ho-2* gén mindkét szervben két fázisban indukálódott a magas koncentrációban alkalmazott Cd expozíciót követően; 2,5-3,5-szeres indukciót tapasztaltunk 6 órás expozíció után, amelyet kontroll szintű expresszió követett, majd 72 órás kezelés következtében újból indukálódott (14.B ábra).



**14. ábra.** A *ho-1* és *ho-2* gének expressziójának időbeli lefolyása és a Cd felhalmozódása a májban (A) és a vesében (B) 6-72 órás 10 mg/l Cd kezelést követően. A grafikonon az mRNS szinteket a  $\beta$ -aktin-hoz viszonyítva ábrázoltuk. \* $p < 0,05$  (kontrollhoz viszonyítva)

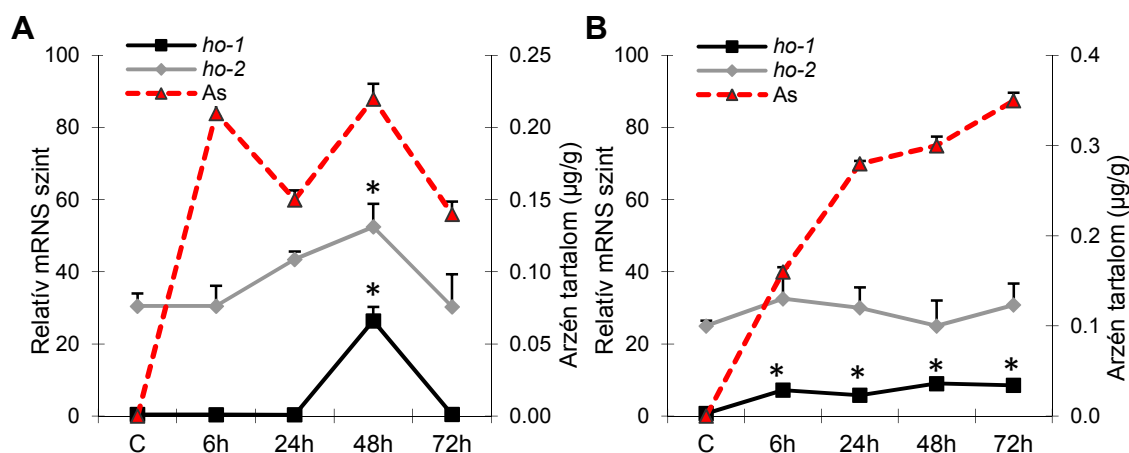
## Az As-kezelés hatása

A *ho-1* és *ho-2* gén expressziójának időbeli lefutását a májban és a vesében 1 mg/l és 10 mg/l koncentrációjú akut As expozíciót követően a 15. és 16. ábrán mutatjuk be. A májban az 1 mg/l koncentrációban alkalmazott As két fázisban indukálta a *ho-1* gént: az expresszió 24 órás expozíciót követően közel 30-szorosra emelkedett, majd egy szignifikáns csökkenés után egy újabb, ~45-szörös indukció következett be 72 óránál (15.A ábra). A vesében ez a kétfázisú indukció 6 és 48 órás expozíció után volt kimutatható (~25-szörös), a 24. órában a *ho-1* mRNS jelenlétének teljes hiányát tapasztaltuk. A *ho-2* gén mérsékelt indukciója (1,5-2,5-szeres) volt megfigyelhető a májban és a vesében is (15.A és B ábra).



**15. ábra.** A *ho-1* és *ho-2* gének expressziójának időbeli lefolyása és az As felhalmozódása a májban (A) és a vesében (B) 6-72 órás 1 mg/l As kezelést követően. A grafikonon az mRNS szinteket a  $\beta$ -aktin-hoz viszonyítva ábrázoltuk. \* $p < 0,05$  (kontrollhoz viszonyítva)

A nagy dózisú As mindkét *ho* gén expresszióját indukálta a májban; 48 órás expozíciót követően a *ho-1* gén 25-szörösös indukciót ért el, míg a *ho-2* gén indukciója 1,8-szoros volt. A 72 órás kezelés eredményei már ismét a *ho* gének alap szintű expresszióját mutatták (16.A ábra). Vesében a *ho-1* gén folyamatosan indukálódott a 10 mg/l koncentrációban alkalmazott As expozíciót követően; a 6 és 72 óra közötti kezeléseket követően mért mRNS mennyisége állandó volt. A *ho-2* gén kifejeződését vesében nem befolyásolta a nagy dózisú As-kezelés (16.B ábra).



**16. ábra.** A *ho-1* és *ho-2* gének expressziójának időbeli lefolyása és az As felhalmozódása a májban (A) és a vesében (B) 6-72 óras 10 mg/l As kezelést követően. A grafikonon az mRNA szinteket a  $\beta$ -aktin-hoz viszonyítva ábrázoltuk. \* $p < 0,05$  (kontrollhoz viszonyítva)

### 5. Fém felhalmozódás májban és vesében

A Cd és As felhalmozódás mértékét a májban és a vesében az expozíció 6. és 72. órája között vizsgáltuk. A Cd felhalmozódása mindkét szervben az idő előrehaladtával folyamatosan nőtt. 10 mg/l koncentrációban alkalmazott Cd kezelés során a szervek 3-4-szer több Cd-ot halmoztak fel, mint az 1 mg/l koncentrációjú kezelés során (13. és 14. ábra). Vesében az idő függvényében nőtt az akkumulálódott As mennyisége, ugyanúgy a májban is kis dózist követően. A nagy dózisú expozíció során ingadozó a máj As tartalma. 10 mg/l koncentrációban alkalmazott As kezelés során a szervek 2-3-szor több As-t halmoznak fel, mint az 1 mg/l koncentrációjú kezelés során (15. és 16. ábra). A mérések adataiból az is látható, hogy a szervekben felhalmozódott Cd koncentrációja két nagyságrenddel nagyobb, mint az As koncentrációja.

### 6. A máj és a vese GSH és GSSG tartalma és LP-ja

A GSH/GSSG arányát gyakran a celluláris redox állapot egy meghatározott mutatójaként használják. Míg a Cd kis dózisban nem, addig nagy dózisban mindkét szervben a GSH/GSSG arány növekedését eredményezte: 25%-kal emelkedett a májban, és ~150%-kal a vesében. Az As kezelés vesében csökkentette a GSH/GSSG arányt mindkét dózisban (~40% illetve ~70%), míg májban nem volt kimutatható hatása.

Alacsony dózisú As expozíció fokozta a LP-t májban és vesében is, ugyanakkor a magas dózis nem volt hatással a membrán lipidekre egyik vizsgált szövetben sem. A Cd expozíció csak nagy dózisban és csak vesében fokozta a LP-t (3. táblázat).

3. táblázat. A hemoxigenáz gének maximális indukciója és az oxidatív stressz markerek változása nehézfém kezelésekre hatására

		maximális indukció		GSH/GSSG	LP	SOD	Kataláz	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
		<i>ho-1</i>	<i>ho-2</i>					
<b>Kadmium</b>	Máj	KD	1X	2.5X	—	—	↓**	↓*
		ND	15X	3.5X	↑	—	↑*	↑*
	Vese	KD	13X	4X	—	—	—	—
		ND	25X	2.5X	↑*	↑*	—	—
<b>Arzén</b>	Máj	KD	45X	2.5X	—	—	↓*	—
		ND	25X	1.7X	—	—	↓***	—
	Vese	KD	25X	1.5X	↓**	↑*	↑**	—
		ND	10X	1.3X	↓**	—	↑**	↑**

A nyilak a változás irányát jelzik. Statisztikai analízis (ANOVA): \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001. KD=1 mg/l ; ND=10mg/l

### 7. Fém-indukálta változások SOD és KAT aktivitásában, valamint a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> koncentrációban

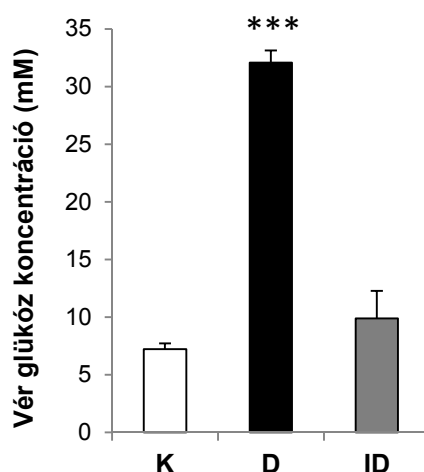
A májban az alacsony dózisú Cd csökkentette a KAT aktivitás és a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> koncentrációt, míg a SOD aktivitás változatlan maradt. A magas dózisú Cd expozíció során nőtt a SOD aktivitás, és ennek következtében a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-tartalom is emelkedett, a KAT aktivitása nem változott. Vesében a Cd egyik alkalmazott koncentrációban sem volt jelentős hatással a fenti markerek kifejeződésére: nem változott szignifikánsan sem a vizsgált enzimek aktivitása, sem a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> koncentrációja.

A májban az As csökkentette a KAT aktivitását, azonban a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> koncentráció nem változott. A SOD aktivitását csak a nagy dózisú kezelés csökkentette. A vesében az As mindkét dózisban körülbelül azonos mértékben növelte a SOD aktivitást és a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> koncentrációt. A KAT aktivitását csak a nagy dózisú kezelés indukálta (3. táblázat).

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

### 1. Diabétesz indukálása a kísérleti állatokban

A kísérletünkben felhasznált állatok vércukor koncentrációját a kísérleti periódus alatt végig nyomon követtük. A STZ-nal kezelt patkányok mindegyikének szignifikánsan magas volt a szérumban a glükóz koncentrációja: a diabéteszes csoportban több mint négyszer magasabb vércukor koncentráció értékeket mértünk a kontroll állatokhoz képest. Az azonnali inzulinkezelés a hiperglikémiát hatékonyan csökkentette; a naponta két dózisban adott inzulin a kontroll értékekhez közeli szinten tartotta a patkányok vércukor koncentrációját (17. ábra).

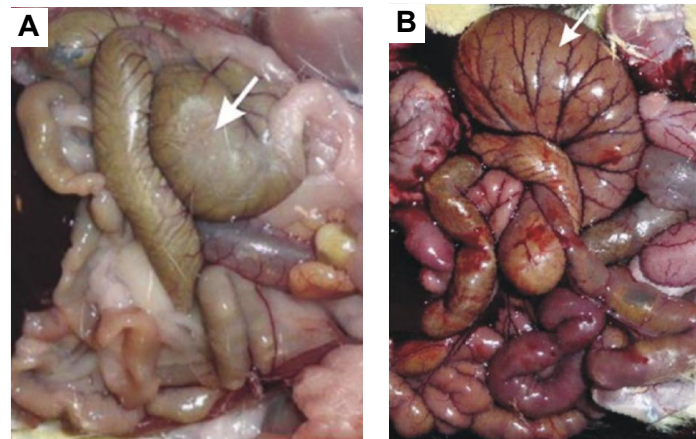


**17. ábra.** Kontroll (K), diabéteszes (D) és inzulinnal kezelt diabéteszes (ID) patkányok szérumban a glükóz koncentrációja a kezelést követő 10. héten. \*\*\* $p < 0,001$  (\*kontrollhoz viszonyítva)

### 2. A diabétesz okozta károsodások

A 10 hetes kísérleti periódus végén feltártuk az állatok hasüregét, ahol látható különbségeket tapasztaltunk az egyes csoportok között; diabéteszes állatok vakbele megnagyobbodott és a bélcsatornája lilás színváltozást mutatott, amely ischémiára vagy gyulladásra enged következtetni (18. ábra).

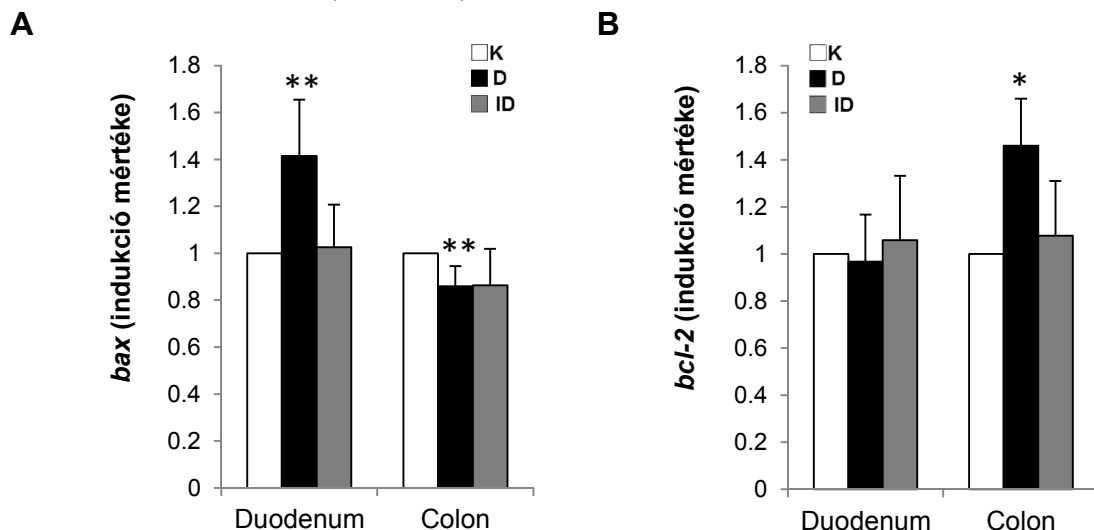




**18. ábra.** Kontroll (A) és diabéteszes (B) patkányok hasüregben elhelyezkedő bélsatornáról készült reprezentatív képek. (a nyílak a cökumot jelölik)

*A diabétesz hatása a pro- és anti-apoptotikus markerekre*

A pro-apoptotikus *bax* és az anti-apoptotikus *bcl-2* mRNS mennyiségének aránya szignifikáns különbséget mutatott a cukorbeteg patkányok mindkét bélszakaszában a kontrollokéhoz képest. A cukorbeteg duodenumában 40%-kal magasabb volt a *bax* mRNS mennyisége a kontroll és az inzulinnal kezelt csoporthoz viszonyítva. A vastagbélben eltérő expressziós mintázatot figyeltünk meg; a *bax* gén downregulációja során a kifejeződésben 15-20%-os csökkenést tapasztaltunk (19.A ábra). A hiperglikémia változásokat eredményezett az anti-apoptotikus hatású *bcl-2* gén kifejeződésében is; 40-45% növekedés jellemezte a vastagbelet, azonban nem volt változás a duodenumban (19.B ábra).

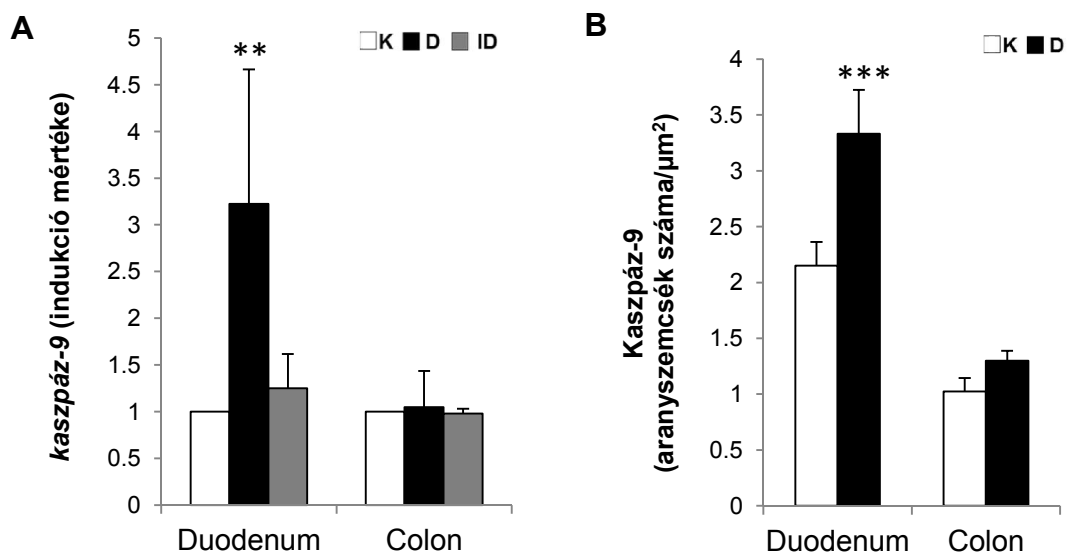


**19. ábra.** A pro-apoptotikus *bax* és az anti-apoptotikus *bcl-2* gén expressziós mintázata kontroll (K), diabéteszes (D) és inzulinnal kezelt diabéteszes (ID) patkányok különböző bélszakaszaiban. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  (\* kontrollhoz viszonyítva)

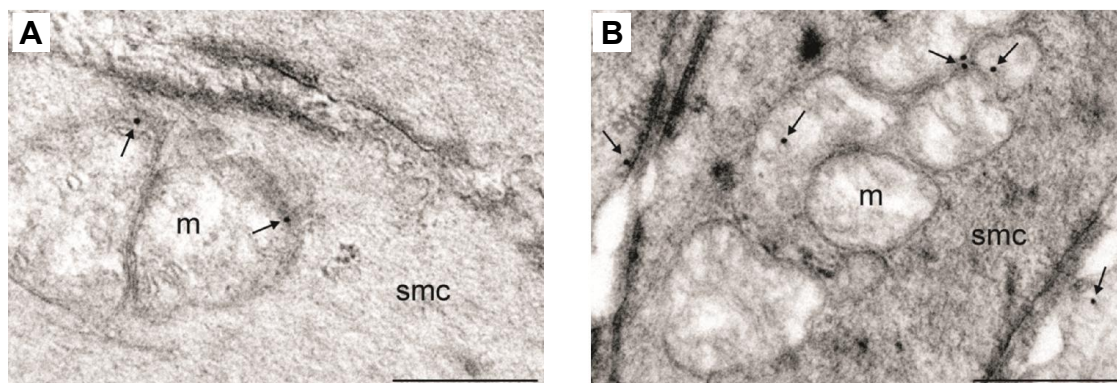
Annak következtében, hogy a *bax* és a *bcl-2* gének szabályozása ellentétes a két vizsgált diabéteszes bélszakaszban, a *bax/bcl-2* arány még kifejezőbb különbségeket mutatott; a duodenumot 50%-os növekedés jellemezte, míg a colonban 40%-os csökkenést számoltunk.

Egy másik pro-apoptotikus marker gén, a *kaspáz-9* expressziós mintázata hasonlóságot mutat a *bax* expresszióval. A duodenális *kaspáz-9* mRNS mennyisége a cukorbetegekben szignifikáns, 3-szoros növekedést mutatott, míg az inzulin-kezelés kontroll szinten tartotta az értékeket. A gén expressziós mintázata nem változott a kezelt csoport colonjában (20.A ábra).

A génextpressziós változások eredményeit a bél kaspáz-9 fehérje expressziójának vizsgálatával erősítettük meg kvantitatív posztembedding immunhisztokémiai módszert alkalmazva (21.A és B ábra). Kiszámítottuk az arany részecskék eloszlását a bél szegmensekben, és összehasonlítottuk a kontroll és a cukorbeteg értékeket. A diabéteszes patkányok duodenumában szignifikánsan emelkedett a kaspáz-9 fehérjét jelölő aranyszemcsék mennyisége a kontrollhoz képest, míg colonban ezek száma nem változott (20.B ábra).



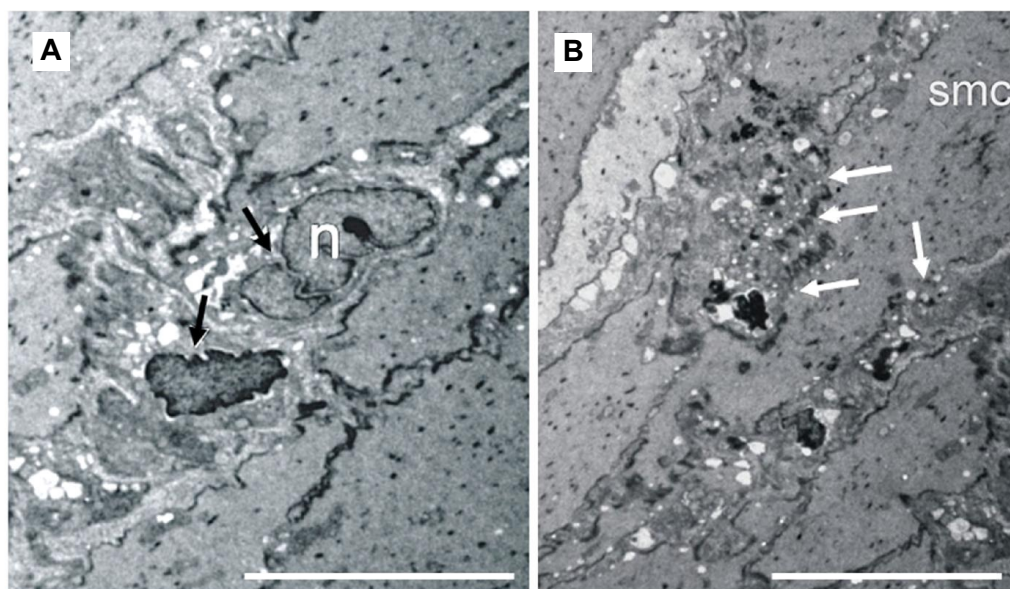
**20. ábra.** A pro-apoptotikus *kaspáz-9* gén expressziós mintázata (A) kontroll (K), diabéteszes (D) és inzulinnal kezelt diabéteszes (ID) patkányok különböző bélszakaszaiban, valamint a kaspáz-9 fehérjét (B) jelölő aranyszemcsék száma a kontroll és diabéteszes patkányok vizsgált bélszakaszaiban. \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  (\* kontrollhoz viszonyítva)



**21. ábra.** Reprezentatív elektronmikroszkópos felvétel a simaizom sejtekről (smc) kontroll (A) és diabéteszes (B) patkányok duodenumából készített ultravékony metszeteken kaszpáz-9 posztembedding immunhisztokémia után (nyíl: kaszpáz-9-et jelölő 18 nm-es arany szemcse, m: mitochondrium; lépték: 500 nm)

#### *A nekrosis jelei vastagbélben*

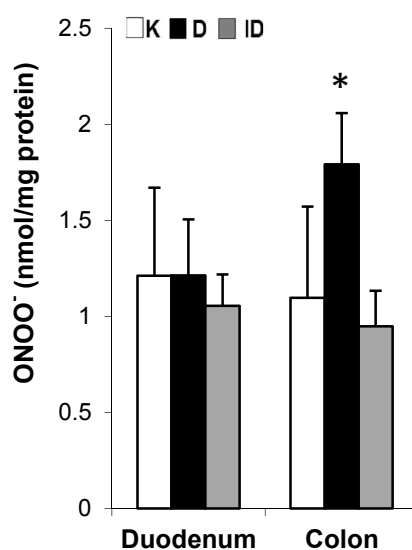
A hiperglikémiás állatokból származó vastagbél minták elektronmikroszkópos szövettani vizsgálatai kimutatták a simaizom sejtek degenerációját, amelyekben a citoplazma alig felismerhető (22. ábra). Az ilyen sejtekre jellemző, hogy a plazmamembránja elvesztette a szerkezeti integritását, aminek az a következménye, hogy az intracelluláris tartalom a sejtközi állományba ömlik, ami olyan immunológiai folyamatokat indít be, mely végső soron gyulladást eredményez.



**22. ábra.** Reprezentatív elektronmikroszkópos felvételek a nekrotizáló simaizom sejtekről colonból készített ultravékony metszeteken. Károsodott izomsejtek (A) alig felismerhető citoplazmával (fekete nyíl) és lokális membránsérülések (B) szivárgó citoplazmával (fehér nyíl). n: nucleus, smc: simaizom sejtek, lépték: 10  $\mu$ m

### 3. A bélszakaszok ONOO<sup>-</sup> koncentrációja a diabétesz kialakulását követő 10. héten

Megvizsgáltuk a STZ-indukált diabétesz és inzulin-kezelés hatását a ONOO<sup>-</sup> képződésre patkány bélben 10 héttel a cukorbetegség kialakulása után. A vastagbél ONOO<sup>-</sup> koncentrációja szignifikánsan emelkedett diabéteszes patkányokban, míg az inzulinnal kezelt cukorbetegké hasonló volt a kontroll szinthez. A duodenumban nem tapasztaltuk a ONOO<sup>-</sup> tartalom szignifikáns változását egyik vizsgált csoportban sem (23. ábra).

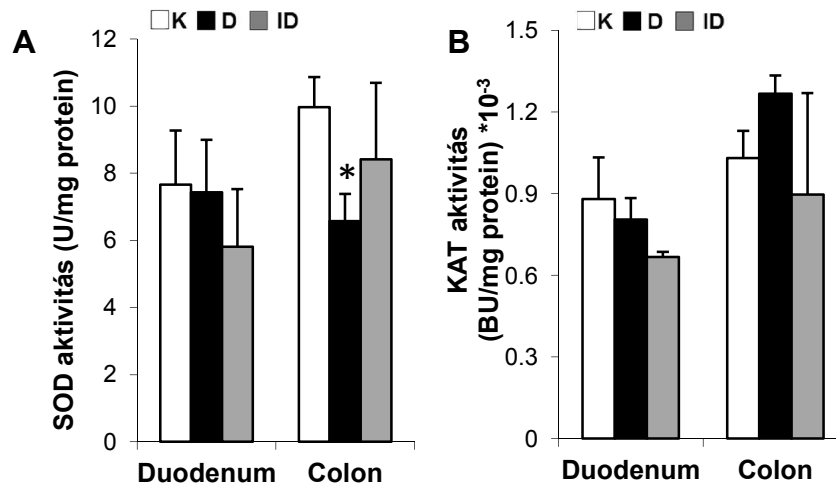


**23. ábra.** A ONOO<sup>-</sup> koncentráció kontroll (K), diabéteszes (D) és inzulinnal kezelt diabéteszes (ID) patkányok különböző bélszakaszaiban. \* $p < 0,05$  (\* kontrollhoz viszonyítva)

### 4. Az antioxidáns védelmi rendszer

#### A SOD és KAT aktivitása különböző bélszakaszokban

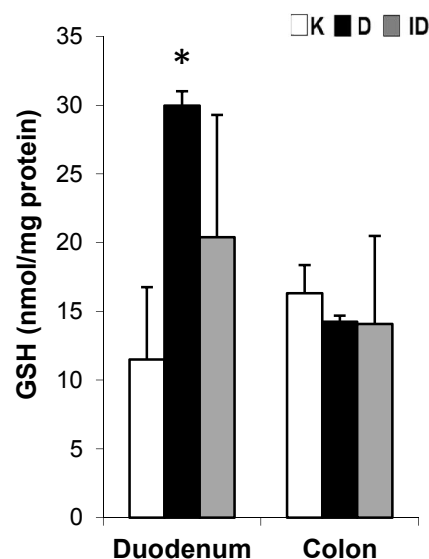
SOD aktivitása nem változott a kezelések hatására a duodenumban, ugyanakkor a diabéteszes patkányok vastagbelében csökkent aktivitásról számolhatunk be. Az inzulinkezelés nem okozott szignifikáns eltéréseket a SOD aktivitásában egyik vizsgált szakaszban sem (24.A ábra). A KAT aktivitását nem befolyásolta sem a fennálló hiperglikémiás állapot, sem az inzulinkezelés, egyik vizsgált bélszakaszban sem tapasztaltunk jelentős eltéréseket az enzim aktivitásában a kontroll szinthez képest (24.B ábra).



**24. ábra.** A SOD és KAT enzim aktivitása kontroll (K), diabéteszes (D) és inzulinnal kezelt diabéteszes (ID) patkányok különböző bélszakaszaiban. \* $p < 0,05$  (\*kontrollhoz viszonyítva)

*A GSH homeosztázis alakulása különböző bélszakaszokban*

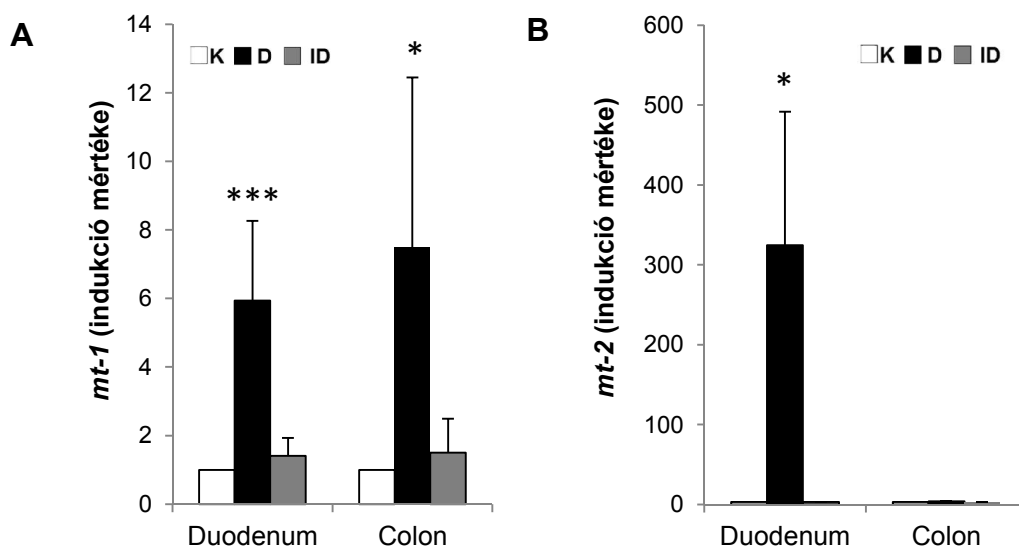
A duodenum GSH koncentrációja 2,5-szeres növekedést mutatott a diabéteszes patkányokban a kontroll csoport GSH értékeihez képest (25. ábra). Az inzulinkezelést követően is emelkedett GSH szintet mértünk, azonban ez nem volt szignifikáns. A csökkent GSSG koncentráció következtében GSH/GSSG arány ebben a bélszakaszban magas volt; 6-szoros növekedését mértük cukorbeteg állatokban. A vastagbél GSH és GSSG tartalma jelentősen nem változott egyik kísérleti csoportban sem.



**25. ábra.** A GSH koncentrációja kontroll (K), diabéteszes (D) és inzulinnal kezelt diabéteszes (ID) patkányok különböző bélszakaszaiban. \* $p < 0,05$  (\*kontrollhoz viszonyítva)

*A mt expressziós mintázata különböző bélszakaszokban*

A *mt* expresszióját jelentősen befolyásolta a hiperglikémiás állapot; az *mt-1* gén indukálódott, az mRNS mennyisége 6-szoros növekedést mutatott duodenumban illetve 7-szeresére nőtt a vastagbélben. Az inzulinnal kezelt cukorbeteg patkányok *mt-1* gén expressziója a kontroll szintet közelítette (26.A ábra). Az *mt-2* mRNS a kontrollhoz képest átlagosan több, mint 300-szoros mennyiségben volt jelen a diabéteszes duodenumban, miközben az inzulin kontroll szinten tartotta a génexpressziót. Az *mt-2* gén expressziója colonban sem diabétesz, sem pedig inzulin hatására nem mutatott különbséget (26.B ábra)

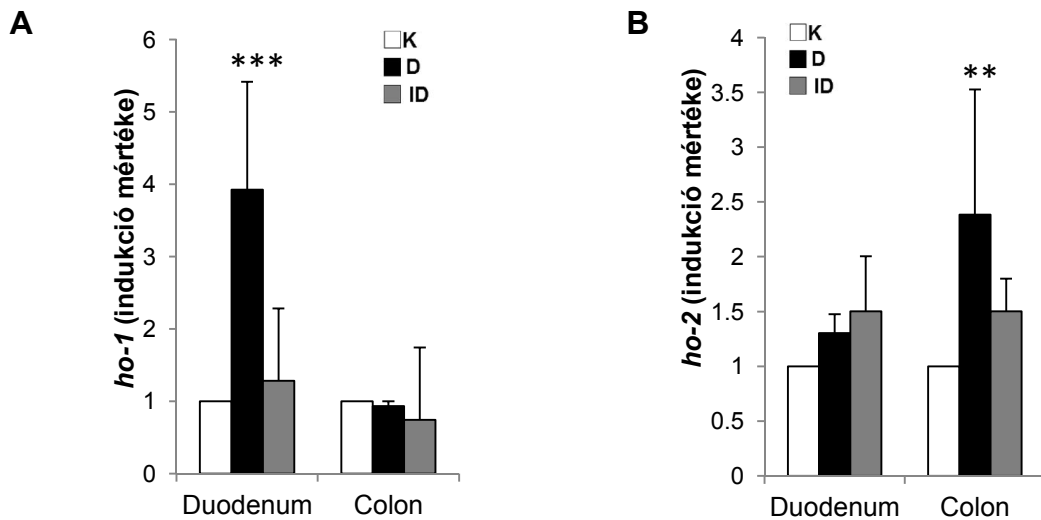


**26. ábra.** A *mt* gének expressziós mintázata kontroll (K), diabéteszes (D) és inzulinnal kezelt diabéteszes (ID) patkányok különböző bélszakaszaiban. \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; (\* kontrollhoz viszonyítva)

*A ho expressziós mintázata különböző bélszakaszokban*

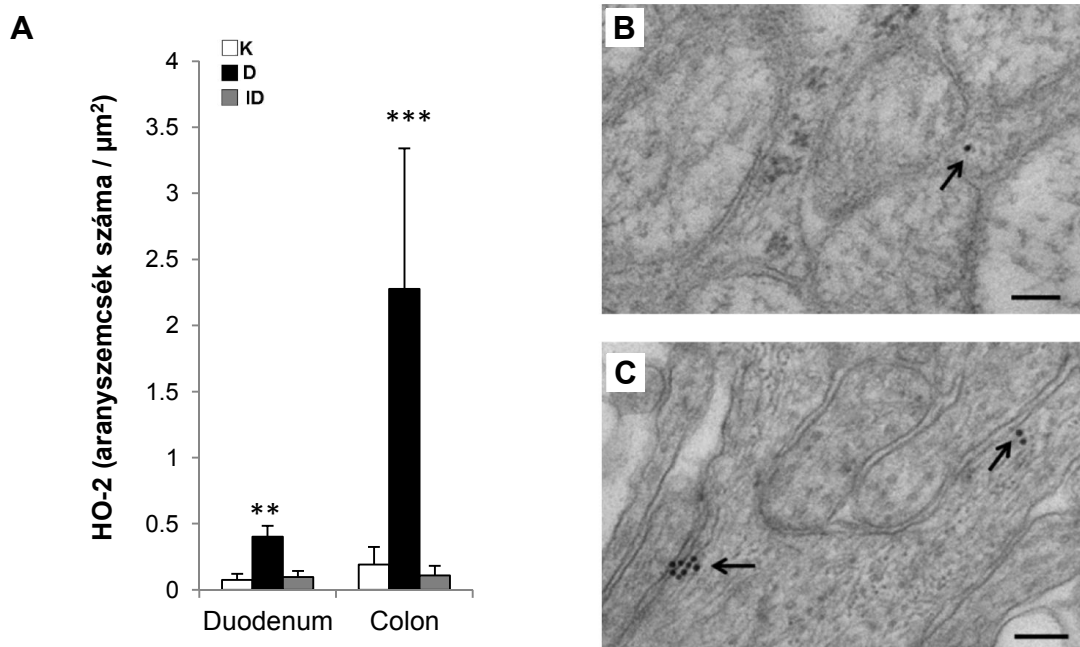
A *ho* indukálható formájának kifejeződésére a magas szérumban glükóz koncentráció eltérő módon hatott a vizsgált bélszakaszokon. 4-szeres növekedést figyeltünk meg a *ho-1* gén expressziójában a duodenumban, a vastagbélben nem volt kimutatható változás. Az azonnali inzulin-kezelés kontrollhoz közeli értéken tartotta mRNS szintet (27.A ábra).

A *ho-2* gén expressziója indukálódott a diabéteszes állatok colonjában. Ezzel szemben a duodenumban a hiperglikémia nem eredményezett jelentős változást a *ho-2* mRNS mennyiségében. Az inzulinnal kezelt állatok egyik vizsgált bélszakaszában sem változott szignifikánsan a *ho-2* gén expressziója a kontrollhoz képest (27.B ábra).



**27. ábra.** A *ho* gének expressziós mintázata kontroll (K), diabéteszes (D) és inzulinnal kezelt diabéteszes (ID) patkányok különböző bélszakaszaiban. \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  (\* kontrollhoz viszonyítva)

A bél HO-2 fehérje expresszióját kvantitatív posztembedding immunhisztokémiai módszerrel vizsgáltuk. Vizsgáltuk az arany részecskék eloszlását a bél szegmensekben, és összehasonlítottuk a kontroll és a cukorbeteg értékeket (28.B és C ábra). A diabéteszes patkányok colonjában jelentős mértékben emelkedett a HO-2 fehérjét jelölő arany szemcsék mennyisége a kontrollhoz képest, míg a duodenumban ezek száma kisebb mértékű változást mutatott (28.A ábra).



**28. ábra.** A HO-2 fehérjét jelölő arany szemcsék száma kontroll (K) és diabéteszes (D) patkányok különböző bélszakaszaiban. Reprezentatív elektronmikroszkópos felvétel a mienterikus ganglionokban kontroll (B) és diabéteszes (C) patkány colonból készített ultravékony metszeteken HO-2 postembedding immunhisztokémia után (nyíl: HO-2-t jelölő 18 nm-es arany szemcse; lépték: 100 nm; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  (\* kontrollhoz viszonyítva)

## VI. MEGBESZÉLÉS

### A. Akut arzén és kadmium expozíció hatása két hemoxigenáz gén és egyéb antioxidáns markerek kifejeződésére pontyban

A nehézfémek felhalmozódása a környezetben veszélyt jelent az ökoszisztémára. Felezési idejük hosszú, csak kis mértékben, és igen lassan ürülnek ki a szervezetből, ezért elraktározódnak és felhalmozódnak az élőlények szerveiben. A szervezetbe kerülve károsíthatják a makromolekulákat, befolyásolhatják az anyagcsere-folyamatokat és génexpressziós változásokat idézhetnek elő.

A nehézfémek elsősorban táplálékfelvétel útján jutnak a szervezetbe, de jelentős expozíciós forrást jelent a nehézfém szennyezett ivóvíz is. A halak fokozottan ki vannak téve e stresszornak, mivel a kopoltyún és a bőrön keresztül folyamatosan érintkeznek a vízben lévő fémionokkal és a nehézfémekkel szennyezett táplálék felvétele következtében még jelentősebb az expozíció [142]. Szinte minden hal húzában és szerveiben kimutathatók a vizekben jelenlévő szennyező nehézfémek. Ezáltal a halak kiváló modellorganizmusok mind a nehézfém-szennyezés monitorozására, mind pedig a szervezetükben zajló expozíció okozta válaszreakciók tanulmányozására. Munkánk során ponty májban és vesében tanulmányoztuk a *ho* gének kifejeződését. Az expressziós változásokat két toxikus elem, a Cd és az As akkumulációjának, a fém hatására bekövetkező oxidatív stressznek és az antioxidáns védekező mechanizmusok aktiválódásának függvényében vizsgáltuk.

Számos rendszertani csoportban azonosították és vizsgálták már a *ho* géneket, azonban az általunk használt modellorganizmusban, a pontyban még nem. A ponty a kromoszóma száma ( $2n=100-104$ ) és a magas DNS-tartalma alapján tetraploid élőlénynek tekinthető [154]. A tetraploiditás nehézséget okozhat a gének azonosításában és az expressziós vizsgálatokban. Mivel a *ho-1* és a *ho-2* cDNS amplifikációja során kapott PCR termékpopulációk 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. Mindkét cDNS teljes hosszán át húzódó nyitott leolvasási keretből levezettük a ponty HO-k aminosav szekvenciáját. Az emlős HO-hoz hasonlóan a ponty HO-k is hordozzák a transzmembrán domént, továbbá a HO domént, és az ezen belül található, evolúciósan konzervált „*HO signature*” motívumot. A filogenetikai



analízisből látszik, 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 jelentek meg.

Az azonosítást követően meghatároztuk a *ho* gének alap expresszióját néhány létfontosságú szervben és szövetben. A *ho-1* gén alap expressziója alacsony, az átíródó mRNS mennyisége a kimutathatóság határán volt a legtöbb vizsgált szervben és szövetben, kivéve a lépben, a bőrben és a vérben. A *ho-2* gén alap expressziója jelentős, a vizsgált szövetek mRNS mennyiségében különbségek mutatkoztak. A *ho* gének a legnagyobb arányban a lépben expresszálódnak, abban a szervben, ahol az előregedett vörösvértestek elkülönülnek és a Fe újra felhasználásra kerül. Az agyban jelentős a *ho-2* gén expresszió, pedig e szervnek általában nem tulajdonítanak jelentős szerepet a hem lebomlásában. Irodalmi adatok szerint a *ho-2* mRNS és fehérje nagy mennyiségben van jelen a patkány agyban is. Ennek egyik magyarázata, hogy a HO-k által képződő CO fontos szerepet tölthet be neurotranszmitterként ugyanúgy, mint az NO [122, 209, 226]. A jelentős mértékű alap expresszió másik lehetséges magyarázata az, hogy az agynak fokozottabb antioxidáns védelemre lehet szüksége magas lipidtartalma és jelentős oxigénfogyasztása miatt [48].

A nehézfémeket a halak felveszik környezetükből, s beépítik azt szervezetükbe. Elsősorban a kopoltyún és a bélén keresztül szívódik fel a legtöbb toxikus elem, ott ahol az epitélium a legvékonyabb. Mivel ezek a szövetek jól vaszkularizáltak, a felvett fémek a vérárammal könnyen eljuthatnak a célszervekhez. A fémfelhalmozódást a halakban összetett és sokrétű mechanizmus határozza meg, amit befolyásol a fém típusa, toxicitásának hatásmechanizmusa és kémiája [115]. Általában a legnagyobb mértékű fémfelhalmozódást májban és vesében mérték, míg alacsonyabbat izomban és zsírban [88]. A szervek közti különbség az akkumuláció mértékében azok élettani funkcióiból adódnak [99]. A máj és a vese fontos szerepet játszik a toxikus vegyületek, így a nehézfémek méregtelenítésében, ezért kísérleteinkben e két szervben vizsgáltuk a Cd és az As felhalmozódását és a kezelés hatását az oxidatív státuszra és az antioxidáns enzimekre, valamint a *ho* gének kifejeződésére.

Eredményeink azt mutatják, hogy a vizsgált nehézfémek akkumulációja szövet- és dózis-függő. A Cd koncentráció az expozíciós idővel arányos mértékű növekedést mutat a szövetekben. A vese Cd tartalma jóval magasabb, mint a májé. Ez az eredmény összhangban van olyan irodalmi adatokkal, melyek szerint a Cd főleg vesében halmozódik fel [3]. A vérbe jutó Cd jelen lehet szabad ion formájában, vagy

albuminhoz és más plazmafehérjéhez kötődhet, és komplexet képezhet MT-ekkel. A szabad és albuminhoz kötött formát a májsejtek felvehetik, ezt követően az albumin degradálódik. A felszabaduló Cd fokozza a MT mennyiségét a sejtben, majd ott komplexet képez vele. A CdMT komplex a sejtől kijutva a vérárammal eljut a vesébe. Endocitózist követően a lizoszómákban degradálódik, a felszabaduló Cd pedig közvetlenül károsítja a membránt és a sejt szervecskéket [81]. Ezek egy része ismét újonnan szintetizált MT-ekhez köt, s a komplexek a vesesejtek citoplazmájában felhalmozódhat [177].

Általánosságban elmondható, hogy az As legnagyobb mennyiségben az izomban akkumulálódik, míg a májban és vesében kisebb mértékű a felhalmozódás, melyek mennyisége közel azonos [189]. Eredményeink szerint az As expozíció korai szakaszában az akkumuláció mértéke májban és vesében többé-kevésbé hasonló, függetlenül az alkalmazott dózistól, azonban a későbbi időpontokban már mennyiségi eltérések mutatkoznak. A vese As koncentrációja kismértékben ugyan, de meghaladja a májét. Az As biotranszformációja már a felvételét követően megkezdődik a metilálás során, melynek fő színtere a máj. Ezért ez a szerv van kitéve leginkább a toxikus hatásának [160]. Édesvízi halakban kétféle oxidációs formában van jelen metilált As. Ezek lehetnek arzenolipidek és arzenocukrok, amelyek toxicitása eltérő. Feltételezhetően e formák felelősek az As patofiziológias hatásaiért [20, 162, 223]. A vesére kifejtett toxikus hatása szintén bizonyított halakban; akut As kezelést követően patológias elváltozásokat tapasztaltak [175]. A májból eljuthat a vesébe is, feltételezhetően MT-hez kötődve - akár csak a Cd -, mivel az képes a szerves és szervetlen As vegyületek megkötésére is [7, 91]. Az arzénvegyületek jelentős része kiválasztódik a vizelettel, a többi visszaszívódhat.

A nehézfém-kezelés változásokat eredményezett a pontyok oxidatív státuszában. Az antioxidáns védelmi rendszeren belül három különböző mechanizmusra fókuszáltunk. Vizsgáltuk a SOD és a KAT enzimek aktivitását, valamint a  $H_2O_2$  képződést, melyekből következtethetünk a képződő  $\bullet O_2^-$  mennyiségére. A GSH redox rendszer egyes tagjai, vagyis a GSH és a GSSG mennyisége, és azok egymáshoz viszonyított aránya jelzésértékű lehet az oxigén szabadgyökök által kiváltott oxidatív stressz hatásainak felmérésére. A hemoxigenáz rendszert vizsgálva pedig információt kaphatunk az oxidatív stressz ellen indukálódó, endogén védekező és adaptációs mechanizmusokról. Vizsgálataink során kapott eredmények azt mutatják, hogy ezek a válaszreakciók szerv- és stresszor-specifikusak. Ezt legjobban az As kezelést követő

változások tükrözik, mivel az antioxidáns enzimek aktivitása a májban és vesében ellentétesen változik. Ezek a változások összefüggésben állhatnak a  $\text{H}_2\text{O}_2$  szöveti koncentrációjával. Vesében fokozott  $\text{H}_2\text{O}_2$  képződés tapasztalható. Ez annak lehet a következménye, hogy a  $\bullet\text{O}_2^-$  nagy mennyiségben termelődik, mely hatására a SOD aktiválódik. A szervezet a  $\text{H}_2\text{O}_2$  eliminálását egyrészt a KAT aktivitás fokozásával érheti el, másrészt a GSH redox rendszer aktiválásával a GPx aktivitásának fokozása révén. A fokozott KAT aktivitás mellett a GSH/GSSG arány csökkenése is megfigyelhető ebben a szervben, amely a GSH szint csökkenés és a GSSG szint emelkedés következménye, s amit a GPx működése befolyásolhat. A változások oxidatív károsodást jelezhetnek [181], mivel az arány csökkenése a GSH fokozott oxidációjára utal, amelyet bármely, a sejtet érő oxidatív stresszhatás előidézhethet. A májban nem változik a  $\text{H}_2\text{O}_2$ , viszont az antioxidáns enzimek aktivitása lecsökken. Ez utalhat arra, hogy nincs fokozott  $\bullet\text{O}_2^-$  termelődés. Ha mégis, az nem a SOD és KAT enzimek által katalizált reakciókban semlegesítődik, hanem elreagál más molekulákkal, önmagánál toxikusabb vegyületeket képezve. A NO-dal ONOO<sup>-</sup>-et képezhet, de a  $\text{H}_2\text{O}_2$ -vel közösen részt vehet  $\bullet\text{OH}$  képző reakciókban, mivel a KAT csökken, a GSH/GSSG aránya pedig változatlan, ezért valószínűleg a GPx sem semlegesíti azt. A Cd expozíciót követő változások kevésbé voltak markánsak, de a szerv-specifitás egyértelműen kimutatható. Az enzimek aktivitása májban szintén összefügg a  $\text{H}_2\text{O}_2$  szöveti koncentrációjával. Növekvő SOD aktivitás fokozott  $\text{H}_2\text{O}_2$ -t eredményez, ugyanakkor a KAT aktivitása csökken a  $\text{H}_2\text{O}_2$  szint csökkenésével. A kapott értékek alapján úgy tűnik, hogy dóziszfüggő változások mennek végbe májban. Habár a vese a Cd egyik célszerve, hatására mégsem tapasztalható változás a mért értékekben. Lehetséges, hogy épp az elsődleges védelmi vonal aktiválódásának késése vagy elmaradása vezethet e szerv károsodásához. Ugyan a GSH/GSSG arány vesében valamelyest nő, de ez nem a GSH szint emelkedéséből adódik, hanem a GR esetleges aktiválódásából. Szakirodalmi adatok segítségével sem kaphatunk egybehangzó választ a változásokra, mivel a mért paraméterek eredményei nem voltak összhangban. A különböző expozíciós körülmények eredményei például a SOD és a KAT fokozott vagy csökkent aktivitásáról is beszámoltak [61, 69, 96, 125]. Halakban mind Cd-, mind As-kezelést követően sok esetben a SOD és a KAT aktivitás csökkenését figyelték meg. [82, 156, 170, 186, 194]. A csökkent SOD aktivitás következtében a  $\bullet\text{O}_2^-$  mennyisége fokozódhat, mivel a szövetek nem képesek megfelelően hatástalanítani a szabadgyököket. A KAT aktivitás csökkenés hátterében több mechanizmus is állhat. A termelődő  $\bullet\text{O}_2^-$  inaktiválhatja magát

az enzimet, vagy kölcsönhatás jöhet létre a Cd és a KAT katalitikus alegysége között [224], emellett felléphet a Fe hiánya, amely az aktív centrum lényeges eleme [96]. A GSH státusz változását szintén kimutatták már halakban fém expozíciót követően. Jellemző, hogy akut kezelések hatására csökken a GSH, s ez összhangban van a mi eredményeinkkel is. Krónikus expozíció során megfigyelt GSH koncentráció növekedés viszont adaptációt jelezhet [198].

A hemoxigenázokról elmondható, hogy indukálható formája, a HO-1 számos stimulusra, így a nehézfém expozícióra is fokozott expresszióval válaszol, míg konstitutív formájára, a HO-2-re ez kevésbé jellemző. Vizsgálati eredményeinkkel összhangban a szakirodalmi adatok is szolgálnak arra vonatkozó eredményekkel, mely szerint a fémkezelés jelentősen indukálta a HO-1-et kódoló gén expresszióját, míg a *ho-2* gén expresszióra csak kismértékben hatott. Az akkumulálódó fém mennyisége és a *ho* gének expressziója között nem találtunk közvetlen összefüggést. Eredményeink alapján úgy tűnik, hogy az As hatékonyabb induktora a *ho-1* génnek, mint a Cd. A *ho-1* gén expressziója As expozíciót követően közel kétszerese a Cd által indukált szintnek. Az As hatása kifejezettebb a májban, annak ellenére, hogy a vese As-tartalma magasabb. Ennek egyik lehetséges magyarázata, hogy a májnak nagyobb védettségre van szüksége - mivel főszerepet játszik az As detoxifikációs folyamatokban biotranszformáció és exkréció által - s ezt így próbálja a szervezet biztosítani. Cd expozíció során bekövetkező *ho-1* gén expressziós változások vesében jól korrelálnak a Cd-tartalommal. Az indukció mértéke is ebben a szervben a legnagyobb, ami abból adódhat, hogy a toxikus hatása legfőképpen vesében érvényesül. Szakirodalmi adatok Cd- és As-kezelés hatására kialakuló oxidatív stresszben szintén indukciót mutattak ki különböző kísérleti modellorganizmusok szerveiben [6, 101, 157, 183], köztük halak májában, lépében is [95].

A LP mérésével az oxidatív stressz okozta károsodás mértékét határoztuk meg. A szabadgyökök gyorsan reagálnak a biológiai membránokkal, mivel nagy mennyiségben tartalmaznak telítetlen zsírsavakat, melyek szubsztrátként szolgálnak a gyökös reakciókhoz [35]. A LP következtében megváltozik a membrán szerkezete, fluiditása és permeabilitása. Habár a máj az a szerv, amely elsődlegesen ki van téve az As toxikus hatásának, az As expozíció mindkét szervben fokozott LP-t eredményezett [160]. A Cd csak vesében fokozta az LP-t, ami összhangban van azzal a megállapítással, miszerint a Cd főleg vesében halmozódik fel, ami a toxicitás fő célpontjává teszi. A fémterhelést követő fokozódó LP a szakirodalomból is ismert a májban, a vesében és

halak más szöveteiben egyaránt. A háttérben az állhat, hogy a Cd és az As expozíció során fokozódhat az aldehid termelődés vagy csökkenhet a GSH szint, illetve, hogy a fémek kölcsönhatnak a membrán foszfolipidekkel [8, 9, 153]. Összefüggést találtunk a LP mértéke és a *ho-1* gén indukálódása között. Ahol a legnagyobb mértékben indukálódott a *ho-1* gén a kezelést követően, ott fokozott LP-t mértünk. Ennek lehetséges magyarázata a HO-k túlzott mértékű expressziója, aminek már káros következményei lehetnek [191]. Háttérben a hemből felszabaduló redox aktív Fe toxikus tulajdonsága állhat [51]. Mielőtt még a ferritin megkötné azt, fokozott gyöképződést eredményezhet ( $\bullet\text{OH}$ , alkoxi- és peroxi gyökök), minek következtében a makromolekulák károsodása jelentősen fokozódhat. Irodalmi adatok szerint As és Cd hatására is nagy mennyiségű Fe szabadul fel ferritinból [5] és a mikroszómákból [38], ami tovább erősíti a Fenton-reakciót.

Elképzelhető tehát, hogy a vizsgált modellrendszerben megfigyelt LP-s károsodások háttérben a HO enzimek által katalizált reakció során felszabaduló nagy mennyiségű Fe pro-oxidáns tulajdonsága áll.

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

A hiperglikémia során fellépő oxidatív stressz központi szerepet játszik a cukorbetegség patogenezisében és szövődményeinek kialakulásában. A többi szervhez hasonlóan az emésztőrendszer is ki van téve a diabétesz okozta oxidatív károsodásnak, mégis kevés irodalmi adat áll rendelkezésünkre ezzel kapcsolatban.

A béltraktus, mely szakaszokra osztható anatómiai felépítése alapján, érzékenyen reagál a hiperglikémiás állapotra. A korábbi vizsgálataink szerint a diabéteszes patkányok különböző bélszakaszaiban megfigyelt patológiás változások a colon-ileum-duodenum tengely mentén fokozatosan, grádiens-szerűen alakultak ki [27]. Ezek az eredmények két egymástól távol eső szegmensre, a duodenumra és a colonra irányította figyelmünket. Ezért az oxidatív stressz markereket és az antioxidáns védelmi rendszer hatékonyságát a bél e két régiójában vizsgáltuk és hasonlítottuk össze kísérletesen indukált diabéteszes patkány modellben.

A feltárás során szemmel látható elváltozásokat tapasztaltunk a diabéteszes patkányok belén. A vakbél megnövekedett és lilás elszíneződést mutatott, amelyből gyulladásra vagy ischémiára következtethetünk. A magas vércukor koncentráció

következtében az emésztőrendszer sérülhet, ami veszélyeztetheti a bél integritását. Immunhisztokémiai és elektronmikroszkópos vizsgálataink során apoptózis és nekrozis jeleit kerestük diabéteszes patkányokban. Általánosságban elmondható, hogy az apoptózis szükséges a többsejtű organizmus túléléséhez, ellentétben a nekrozissal, mely a szövet pusztulását okozhatja. A programozott sejthalálhoz számos tényező járulhat hozzá, de a legfontosabb elemeihez két fő fehérje családot, a Bcl-2 fehérjét és kaspáz enzimeket sorolják [199]. A Bcl-2 család tagjai kifejeződésükkel vagy propagálják, vagy gátolják az apoptózist. Az általunk vizsgált apoptózis marker gének egyike, a *bcl-2* anti-apoptotikus hatással rendelkező, míg a másik gén, a *bax* pro-apoptotikus tulajdonságú fehérjét kódol [13]. A harmadik vizsgált apoptózis marker, a kaspáz-9 iniciátor szerepet tölt be a programozott sejthalál mechanizmusa során [159]. Vizsgálataink eredményei a markerek bélszakasz-specifikus kifejeződését mutatják. A *bax/bcl-2* arányának növekedése és a kaspáz-9 fokozott expressziója tapasztalható diabéteszes patkányok duodenális szöveteiben. Ez arra utal, hogy pro-apoptotikus fehérjék expressziójának emelkedett szintje és anti-apoptotikus fehérjék expressziójának csökkenése befolyással van az apoptózis kezdeti lépéseire, kiváltva ezzel a programozott sejthalált. Ezzel ellentétben, a diabéteszes állatok vastagbelében alacsonyabb *bax/bcl-2* arányt és változatlan kaspáz-9 expresszió figyelhető meg. A béltraktus hiperglikémiából eredő sérülésének meghatározásához elektronmikroszkópos vizsgálatokat is végeztünk. A diabéteszes patkányok vastagbelében súlyos nekrozis jelei figyelhetők meg szemben a duodenummal. A nekrozis morfológiájára jellemző a sejtszervecskék duzzanata, mitochondriális diszfunkció, plazmamembrán permeabilizálódás, oxidatív stressz, és végső soron a sejt fragmentálódása [219]. Citoszolikus tartalom szivároghat a nekrotikus sejtéből gyulladást okozva a környező szövetekben [108]. Vizsgálataink eredményei különbségeket mutattak ki a bélszakaszok között a képződő ROS mennyiségében és gén expressziós szinten, melyek feltételezhetően kiváltó okai a vastagbélben tapasztalható nekrozisnak.

Az egyik legszembetűnőbb különbség, hogy a  $\text{ONOO}^-$  mennyisége megduplázódott a diabéteszes állatok vastagbélszakaszában. A  $\text{ONOO}^-$  képződésnek kedvez a NO és  $\bullet\text{O}_2^-$  együttes jelenléte magas koncentrációban [140]. Következésképpen, a  $\text{ONOO}^-$  megemelkedett szintje a diabéteszes állatok vastagbelében közvetett bizonyítékként szolgál a  $\bullet\text{O}_2^-$  fokozott termelődésére. Klinikai vizsgálatok során a  $\text{ONOO}^-$  okozta károsodások fokozódását tapasztalták diabéteszben, mely jelentősen hozzájárul a cukorbetegség komplikációinak kialakulásához [158].

Mérgező hatása számos módon megnyilvánulhat, többek között a LP fokozódását és a GSH koncentráció csökkenését okozza, elősegíti az egyszálú DNS törést, a szulfhidril csoportok oxidációját, és az apoptózist [135, 179]. A ONOO<sup>-</sup> közvetlen bejuttatása a bélbe ödémát, gyulladást és nekrozist indukál [169]. A •O<sub>2</sub><sup>-</sup> egy erősen mérgező gyök, amely semlegesítődik a SOD által a KAT enzimmel együttműködve. A fokozott ONOO<sup>-</sup> termelődés szintén magyarázatul szolgálhat a SOD aktivitás csökkenésére a diabéteszes állatok vastagbélszakaszán. Valószínűnek tűnik, hogy a mért alacsony SOD és a változatlan KAT aktivitás annak következménye, hogy a •O<sub>2</sub><sup>-</sup> gyorsan elreagál a NO-dal. Ez a reakció háromszor gyorsabb, mint az endogén SOD által katalizált reakció sebessége, melyben a •O<sub>2</sub><sup>-</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dá alakul [215]. Ellentmondásos eredmények születtek olyan korábbi kísérletekből, ahol szöveti SOD és KAT aktivitást mértek diabétesz során; az enzimek szintje nőtt, csökkent vagy épp változatlan maradt [84]. Ezek az eltérő eredmények adódhattak többek között az állatmodellek típusából és a SOD és a KAT aktivitás meghatározásához használt vizsgálati módszerekből is.

Vizsgálataink eredményeiből arra következtethetünk, hogy a bél bizonyos szakaszain több mechanizmus segíti megőrizni a sejtek integritását és a szervezet homeosztázisát. A GSH, az MT és a HO enzim rendszer indukálása segíthet fenntartani a magas antioxidáns koncentrációt. Ha azonban az antioxidáns védelem elemeinek aktiválódása elmarad, az szintén hozzájárulhat a szövetkárosodáshoz, mivel az védelem nélkül kevésbé ellenálló a sérülésekkel szemben. A GSH fiziológiásan nagy koncentrációban van jelen a szövetekben [15, 98], részt vesz a celluláris védelemben azáltal, hogy semlegesíti a ROS-t [148]. Kísérletünkben a duodenum GSH koncentrációja jelentősen emelkedett diabétesz során. A bélben található GSH jelentős része a májból származik, és az epével választódik ki a duodenumba [14, 18]. Fontos funkciót tölt be a felszívásban és méregtelenítésben, valamint a nyálkahártya védelmében [46]. Diabéteszes egerekben kísérletesen megemelt GSH koncentráció következtében az antioxidáns enzimek aktivitása normalizálódott és a ONOO<sup>-</sup> termelődés csökkent [201]. Ezen adatok tükrében elképzelhető, hogy a magas GSH koncentráció egyike azoknak a mechanizmusoknak, amelyek a mi modellrendszerünkben is hozzájárulnak a fokozottan termelődő ONOO<sup>-</sup> eliminálásához, vagy eleve megakadályozza annak képződését. Mivel a vastagbélben nem tapasztalható emelkedett GSH szint, ezáltal a ROS semlegesítése sem hatékony.

A GSH rendszer mellett az MT-k is jelentős szerepet játszanak a fiziológiás tiol/redox egyensúly fenntartásában –SH csoportjaik révén. Mind a 20 cisztein részt

vehet gyök-kioltó folyamatokban. Vizsgálataink eredményei azt mutatják, hogy az *mt* gén expresszióját jelentősen befolyásolja a hiperglikémiás állapot. Míg az egyik gén mindkét bélszakaszban indukálódik, addig a másik gén csak duodenumban. Az MT-k figyelemre méltó antioxidáns kapacitásuk révén gátolhatják az oxidatív stressz kialakulását, amely diabéteszes szövödményekhez vezetne. A nagy mennyiségben jelenlévő MT jótékony hatásáról számos közleményt találunk az irodalomban. Diabéteszes állatokon végzett kísérletek eredményei azt mutatták, hogy a májban és a vesében megemelkedett a MT szintje [43, 59, 204], és hogy a MT túltermelődése egér szívben jelentősen akadályozta a cukorbetegség okozta kardiomiopátia kialakulását [36]. A saját és szakirodalmi eredmények alapján úgy tűnik, hogy a vastagbélben tapasztalt indukció mértéke nem elegendő ahhoz, hogy kifejthesse védelmi feladatait a káros hatásokkal szemben.

A HO-ok az általános antioxidáns védelmi rendszer részei. 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 [17, 192]. Annak ellenére, hogy két izoformája, a HO-1 és a HO-2 hasonló fizikai és kinetikai tulajdonságokkal rendelkeznek, szabályozásuk mechanizmusa eltérő, és különböző szöveti eloszlást mutatnak [120, 121]. Limitált azoknak az irodalmi adatoknak a mennyisége, amelyből információhoz juthatunk a HO-k emésztőrendszerbeli expressziójáról. Ezek eredményei alapján elmondható, hogy a HO-1 csak kis mértékben expresszálódik bélben, azonban betegség, sérülés és gyulladás kiválthatja az indukcióját. A HO-2 jelenlétét már számos fajban kimutatták az egészséges bél minden szakaszában [67]. A mi modellrendszerünkben a magas vércukorszint megnövelte a *ho-1* gén expressziót duodenumban. A vastagbélben nem észleltük a *ho-1* gén expressziós változását, azonban a *ho-2* gén expressziója fokozódott, s a HO-2 enzim mennyisége itt 11-szeresére nőtt. A ROS nemcsak a HO-2 expresszióját fokozhatja, de aktivitását is befolyásolhatja a CP motívumokként ismert HRM-ek révén. A colonban regisztrált fokozott ONOO<sup>-</sup> képződés oxidatív körülményeket teremtve fokozhatja a HO-2 enzim aktivitását. Ahogy azt már korábban jeleztem, a HO aktivitás túlzott növekedésének (több mint 5-szörös) káros következménye lehet a redox-aktív Fe nagymértékű felszabadulása. Ezáltal fokozódhat a •OH termelődése vagy alkoxi- és peroxi gyökök képződhetnek a membrán lipidek károsodása során [174]. A HO-2 mennyisége összefüggésbe hozható a vizsgálat során tapasztalt nagymértékű *bcl-2* expresszióval, amely következménye a *bax/bcl-2* arány csökkenés. Diabéteszes patkányokon végzett



kísérletekkel is igazolták, hogy a HO túltermelődése anti-apoptotikus fenotípust eredményez, ami a *bcl-2* gén fokozott expressziójával jár [37]. Ezen adatok ismeretében feltételezhetjük, hogy a HO rendszer túlzott indukciója több mechanizmuson keresztül is befolyásolhatja a vastagbélben végbemenő folyamatokat, melyek végső soron a szövet károsodásához vezethetnek.

Az inzulin-kezelés jótékony hatását vizsgálataink megerősítették, mivel minden, általunk mért paraméter értékét a kontroll szint közelében tartotta. A kísérleteink során tapasztalt változásokért és károsodásokért a diabéteszes állatok bélszakaszaiban valószínűleg a magas vércukor koncentráció tehető felelőssé.

Vizsgálataink eredményei azt mutatják, hogy diabétesz során a vastagbél sokkal sérülékenyebb szegmense az emésztőrendszernek, mint a duodenum. Ezt alátámasztja néhány szakirodalmi adat is. Sanders és munkatársai eredményei szerint a vastagbél több endogén ROS-t generál, mint a vékonybél. Annak ellenére, hogy fokozottan működnek az antioxidáns enzimek, a ROS szintje mégis magas ebben a bélszakaszban. Ebből arra lehet következtetni, hogy a vastagbél védelmi rendszere az oxidatív stresszel szemben kevésbé hatékony, mint a vékonybél védekezése [178]. Blázovics és munkatársai szerint a bél proximális szakaszainak antioxidáns védelme intenzívebb, mint a disztális szakaszoké [25], amelynek oka lehet a bél felépítése és az ebből adódó funkcióbeli különbségek. Az anatómiai felépítés hozzájárulhat ahhoz, hogy a duodenum sérül legkevésbé diabéteszes állapotban. Ismert, hogy a vékonybél kezdeti szakasza a duodenum, ahová a savas gyomortartalmon kívül az epehólyag és a hasnyálmirigy váladéka ürül. Ezek bázikus kémhatásuknál fogva segítenek a savas gyomortartalom maró hatásának semlegesítésében. Mivel a gyomor-bél traktusban a duodenum lehet a leginkább kitéve a redox egyensúly változásainak, így már eleve rendelkezhet egy olyan védekező mechanizmussal, ami sértetlenséget biztosít az effajta inzultussal szemben.

## ÖSSZEGZÉS

Stressz hatására a szervezetben különböző patológiás folyamatok indulhatnak be, melynek eredményeként fokozódhat a szabadgyökök képződése, ami oxidatív károsodáshoz vezet. Az oxidatív stressz kivédésére aktiválódik az antioxidáns védelmi rendszer. A kísérleteink során törekedtünk arra, hogy az oxidatív stresszben szerepet játszó szabadgyökök és antioxidánsok, valamint a károsodásra utaló markerek egyaránt reprezentálva legyenek. A vizsgált markerek értékei a különböző stresszorok hatására szövet-, idő- és dóziszfüggően változtak.

A stresszre adott válaszreakciókat egy bonyolult és összetett mechanizmus határozza meg. E mechanizmus része számos biológiai útvonal, melyek különböző pontokon kapcsolódnak egymáshoz, ezzel egy komplex rendszert kialakítva. A stresszválasz attól függ, hogy az adott stresszor hol és milyen módon fejti ki hatását, és mely útvonalakra hat a későbbi folyamatok során. Ahhoz, hogy egy egységesebb képet kapjunk a stresszre adott válaszreakciókról, és hogy megértsük, hogyan működik ez a bonyolult rendszer, érdemes minél több antioxidánst és szabadgyököt bevonni a vizsgálatokba.

## ÖSSZEFOGLALÁS

Kutatócsoportunk fő célja olyan molekuláris mechanizmusok tanulmányozása, melyek az antioxidáns védelmi rendszer aktiválódásához vezetnek. Munkánk során e koordinált rendszer egyes tagjait azonosítottuk és vizsgáltuk különböző patológiás folyamatokban, úgymint a nehézfém expozíció és a STZ-indukálta diabétesz. Tanulmányoztuk e kétféle stresszor hatását (A) a ROS képződésre ( $H_2O_2$ ,  $ONOO^-$ ), (B) az antioxidáns rendszer kifejeződésére (SOD, KAT, GSH/GSSG, MT, HO) és (C) az oxidatív stressz okozta károsodás mértékére (LP, apoptózis, nekrozis).

### Stresszorok

1. A nehézfémek közül a toxikus és karcinogén tulajdonságú Cd-ot és As-t alkalmaztunk kísérletünkben, majd a méregtelenítésben kulcsfontosságú szerepet játszó májban és vesében vizsgáltuk ezek felhalmozódását. Mindkét fémről elmondható, hogy akkumulációjuk szövet- és dózis-függő. Bár mindkettő akkumulációja dózis-függő, azonban a kezelések 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 STZ-kezelés hatására minden állatban szignifikánsan magas szérum glükóz koncentrációt mértünk a 10 hetes kísérleti periódus alatt. Az azonnali inzulin-kezelés a hiperglikémiát hatékonyan csökkentette.

### A. ROS képződés stresszt követően

A kísérleteink során alkalmazott stresszorok indukálták a  $H_2O_2$  és a  $ONOO^-$  képződését. Ezek a molekulák nagy koncentrációban jelentősen hozzájárulnak az oxidatív stressz kialakulásához és a makromolekulák károsításához, képződésük összefüggésben áll a  $\bullet O_2^-$ , valamint a NO fokozott termelődésével. A  $H_2O_2$  koncentrációja nehézfém kezeléseket követően szövet-specifikusan változott; As hatására vesében nőtt, míg a Cd kezelést követően a májban figyeltük meg fokozott termelődését. A  $ONOO^-$  koncentrációja bélszakasz-specifikus módon változott. Diabéteszes patkányok vastagbelében fokozott  $ONOO^-$  képződést tapasztaltunk.

## B. Az antioxidáns védekező rendszer

Vizsgáltunk enzimatis és kis molekulatömegű antioxidánsokat fémterhelést követően és hiperglikémai során. Fémterhelés esetében a SOD és a KAT enzim aktivitás növekedését tapasztaltuk vesében, ott, ahol a két vizsgált szövet közül nagyobb volt a fém felhalmozódás.

Diabéteszes patkány bélben ezen enzimek aktivitása régió-specifikusan változott; vastagbélben, ahol a ONOO<sup>-</sup> koncentráció emelkedését tapasztaltuk, csökkent SOD aktivitás. Ez a jelenség utalhat jelentős mennyiségű NO termelődésére és spontán ONOO<sup>-</sup> képződésre.

A kis molekulatömegű antioxidánsok közül vizsgáltuk a GSH mennyiségi változását és a GSH/GSSG arányt mindkét modellrendszerünkben. A GSH részt vesz az antioxidáns védelemben azáltal, hogy semlegesíti a szabadgyököket, köti a fémeket és szerepet játszik a fiziológiás tiol/redox egyensúly fenntartásában. A GSH/GSSG arány gyakran a celluláris toxicitás meghatározására szolgál, amely stresszor- és szövet-specifikus módon változik. Mindkét fém esetében elmondható, hogy a kezeléseket követően májban nem volt szignifikáns változás. Vesében fém-specifikus változásokat figyeltünk meg. A GSH/GSSG arány növekedés a GSH koncentráció emelkedés következménye. Az arány csökkenéséhez hozzájárult mind a GSSG fokozott képződése, mind pedig a GSH koncentráció kismértékű csökkenése.

A hiperglikémia következtében duodenumban nőtt és colonban nem változott a GSH/GSSG aránya. Az arány növekedése fokozott antioxidáns védelmet jelez, aminek hátterében a GSH megemelkedett koncentrációja és a GSSG szint csökkenése áll.

MT-k kis molekulatömegű antioxidánsok, melyek szintén hozzájárulnak a tiol/redox egyensúly fenntartásához és jelentős szerepet játszanak az oxidatív stresszel szembeni védekezésben. Munkacsoportunk már korábban publikálta azon eredményeit, melyben ponty nehézfém-kezelését követően a *mt* gének szövet-specifikus indukcióját tapasztalták.

A diabéteszes vizsgálat eredményei azt mutatják, hogy mindkét *mt* gén indukálódása szükséges lehet ahhoz, hogy jótékony hatásukat kifejthessék a hiperglikémia során fellépő káros folyamatokkal szemben.

Ugyancsak kis molekulatömegű, de enzimatis hatású HO-k az általános antioxidáns védekező rendszer részei; *in vivo* és *in vitro* vizsgálatok eredménye szerint a HO rendszer különböző stresszorok hatására indukálódik. Vizsgáltuk az *ho* gének

expresszióját mindkét modellrendszerben. Pontyban a *ho* gének nem voltak ismertek, ezért első lépésként azonosítottuk, majd jellemeztük azokat ebben a fajban. A ponty *ho-1* és *ho-2* szekvenciák nagyfokú homológiát mutattak a már ismert halak *ho* génjeivel. A feltételezett aminosav szekvenciákat elemezve elmondhatjuk, hogy a ponty HO hordozza az evolúciósan konzervált doméneket és motívumokat. Vizsgáltuk a *ho* gének kifejeződését fiziológias körülmények között. A *ho-1* mRNS mennyisége a kimutathatóság határán volt a kezeletlen állatok vizsgált szöveteiben, a lép, a bőr és a vér kivételével. A legnagyobb *ho-1* gén expressziót a lépben mértünk. A *ho-2* gén magas szinten expresszáldott az összes vizsgált szövetben; a legmagasabb expressziós szint a bőrben, a legalacsonyabb a vesében volt. A nehézfém kezelés során szövet- és stresszor-specifikusan indukálódott a *ho* gének expressziója, azonban szoros összefüggést nem találtunk az expresszió változás és a két szervben akkumulálódó fém mennyisége között.

A diabéteszes modellben bélszakasz-specifikus változásokat mutattunk ki a *ho*-k expressziójában. Diabéteszes állatok duodenumában a *ho-1* gén, míg vastagbelében 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.

### C. Oxidatív károsodások

Vizsgáltuk a kétféle stresszor által indukált oxidatív károsodásokat. Nehézfém expozíció következtében szövet-specifikus és dóziszfüggő LP-t figyeltünk meg. Az As kis dózisban mindkét szervben fokozott LP-hez vezetett, ellenben a Cd csak nagy dózisban és kizárólag vesében.

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 ROS megnövekedett koncentrációja és az antioxidáns védelem aktiválódásának elmaradása.

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 kizárólag a HO-2 indukálódott jelentős mértékben. Patológias körülmények között fokozott a ROS képződés, és oxidatív környezetben fokozódhat a HO-k aktivitása. Habár a HO enzimeknek citoprotektív hatást tulajdonítanak, irodalmi adatok arra is utalnak, hogy túlzott mértékű expressziójának már káros következményei is lehetnek. Ennek hátterében a hemből felszabaduló redox aktív Fe állhat, ami fokozott gyökképződést eredményezhet. Ez pedig jelentősen hozzájárulhat az általunk vizsgált modellrendszerekben megfigyelt károsodásokhoz.

## SUMMARY

The main goal of our research is to study the molecular mechanisms leading to activation of the antioxidant defense system. We have identified and studied certain components of this coordinated system in various pathological processes, such as heavy metal exposure and streptozotocin (STZ)-induced diabetes. We have studied the effect of these two types of stressors on **(A)** the formation of reactive oxygen species (ROS), e.g. hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) and peroxynitrite ( $\text{ONOO}^-$ ), **(B)** the expression of the antioxidant system members, e.g. superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), the ratio of reduced and oxidized glutathione (GSH/GSSG), metallothioneins (MTs), heme-oxygenases (HOs) and **(C)** the extent of the damage caused by oxidative stress (lipid peroxidation, apoptosis and necrosis).

### Stressors

1. Heavy metals, such as the toxic and carcinogenic cadmium and arsenic, were used in our experiments, and their accumulation was examined in the liver and kidney, which play critical roles in detoxification. Both metals accumulated in a tissue- and dose-dependent manner. Despite the 10-fold difference between the doses applied during the treatments, such a difference in the rate of accumulation was not detected, e.g. in the case of arsenic exposure, the difference was only 1.5-fold. Both metals accumulated to higher extents in the kidney than in the liver.
2. The STZ treatment resulted in significantly elevated serum glucose concentrations in all animals during the 10-week experimental period. Immediate insulin replacement effectively reduced the hyperglycemia.

### A. Formation of ROS following stress

The stressors induced the formation of  $\text{H}_2\text{O}_2$  and  $\text{ONOO}^-$  during the experiments. These molecules in high concentrations play important roles in the development of oxidative stress and damage to biomolecules. Their formation is related to the increased production of superoxide anion and nitric oxide. After heavy metal treatment, the  $\text{H}_2\text{O}_2$  concentration changed in a tissue-specific manner. Arsenic caused an increase in the renal  $\text{H}_2\text{O}_2$  concentration, whereas cadmium caused increased  $\text{H}_2\text{O}_2$  production in the liver.

The concentration of ONOO<sup>-</sup> also changed in a segment-specific manner along the intestine. In the colon of diabetic rats, increased ONOO<sup>-</sup> formation was observed.

### **B. Antioxidant defense system**

Antioxidant enzymes and low molecular weight antioxidants were tested after heavy metal treatment and in diabetic animals. After metal, exposure increased SOD and CAT activities were found in the kidney, where higher metal accumulations were measured.

The diabetic rat intestine also demonstrated region-specific changes; an increased concentration of ONOO<sup>-</sup> and decreased SOD activity were found in the colon. This may indicate the production of significant amounts of nitric oxide and the spontaneous formation of ONOO<sup>-</sup>.

Quantitative changes in the low molecular weight antioxidant GSH and the ratio GSH/GSSG were tested in two model systems. GSH is involved in the antioxidant defense by neutralizing free radicals, binding the metals and maintaining the physiological thiol/redox balance. The ratio GSH/GSSG is often used to determine cellular toxicity, which varies in response to stress in a tissue- and stressor-specific manner. There was no significant change in the liver after metal treatment, but metal-specific changes were observed in the kidney. The increase in the ratio GSH/GSSG resulted from an increased level of GSH. A decrease in the ratio was caused by the elevated formation of GSSG and a slight decrease in the concentration of GSH.

Hyperglycemia resulted in an increased ratio GSH/GSSG in the duodenum, but not in the colon. The increase in the ratio indicated elevated antioxidant protection due to the increased concentration of GSH and the decrease in the GSSG level.

MTs are low molecular weight antioxidants that play an important role in the maintenance of the thiol/redox balance and the defense against oxidative stress. Our research group has previously published results in which the induction of carp *mt* genes in a tissue-specific manner was observed after heavy metal treatment. The results of the current study revealed that the two *mt* genes together could exert beneficial effects against harmful processes during hyperglycemia.

HOs are low molecular weight enzymes that take part in the general antioxidant defense system; *in vivo* and *in vitro* studies have demonstrated the induction of the HO system by different stressors. We examined their expression in both model systems. Carp *ho* genes were first identified and characterized in this species. The carp *ho-1* and



*ho-2* sequences displays strong homology to known *ho* genes in fish. Analysis of the putative amino acid sequence revealed that the carp HO carries evolutionarily highly conserved domains and motifs. We examined the expression of *ho* genes under physiological conditions in certain organs of the carp. The basal levels of the *ho-1* transcripts were at the limit of detectability in all the examined tissues except the spleen, skin and blood. The highest *ho-1* mRNA level was found in the spleen. The *ho-2* gene was highly expressed in all of the examined tissues. The highest level was detected in the skin, and the lowest in the kidney. The expression of the *ho* genes was induced in a tissue- and stressor-specific manner, but these changes did not correlate with the accumulated metals in either organ.

In a diabetic model, intestine-specific changes were detected in the expression of the *ho* genes. The *ho-1* gene was induced in the duodenum, and the *ho-2* gene in the colon, where a large amount of HO-2 protein was measured. The results of gene expression and immunoanalytical measurements suggest that activation of the HO system may be involved in the stress responses in the model systems that we used.

### **C. Oxidative damage**

We examined the oxidative stress-related damage induced by two kinds of stressor. We detected increased lipid peroxidation following heavy metal exposure, the changes proving to be dependent on the dose of the stressor. A low dose of arsenic exposure led to an increase in lipid peroxidation in the liver and kidney. Cadmium affected the lipid peroxidation only at high doses and only in the kidney.

The expression of pro- and anti-apoptotic markers and the incidence of necrosis were region-specific during diabetes. The ratio of the pro- and anti-apoptotic markers in the duodenum may contribute to the initiation of programmed cell death. Unlike in the colon, this rate moved toward the anti-apoptotic markers. Here, we observed necrosis which may have been caused by the increased ROS levels and the lack of the activation of antioxidant defense.

Overall, enhanced lipid peroxidation and necrosis are characteristic features of the damage caused by oxidative stress associated with the significant induction of HOs. We detected increased lipid peroxidation where the *ho-1* gene induction/expression was the largest. The localization of necrosis corresponded with the weak/lack of activation of the antioxidant defense, because only the HO-2 was induced in this gut segment.

Under pathological conditions, ROS formation is increased. The activity of HOs may increase in consequence of the oxidative environment. HOs are cytoprotective enzymes, but the data also suggest that the increased HO activity in the higher range has a deleterious effect: the release of redox active iron before its binding to ferritin can result in enhanced radical formation. This may contribute significantly to the damage observed in our model systems.

## IRODALOMJEGYZÉK

1. Abraham NG, Cao J, Sacerdoti D, Li X, Drummond G. 2009. "Heme oxygenase: the key to renal function regulation," *Am. J. Physiol.* **297**: 1137-1152.
2. Adachi T, Ohta H, Hirano K, Hayashi K, Marklund SL. 1991. Non-enzymic glycation of human superoxide dismutase. *Biochem. J.* **279**: 263-267.
3. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). 2003. Toxicological Profile for Cadmium. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Diseases Control, Atlanta, GA.
4. Aebi HE. 1984. Catalase *in vitro*. In: *Methods Enzymol.* **105**: 121-126.
5. Ahmad S, Kitchin KT, Cullen WR. 2000. Arsenic species that cause release of iron from ferritin and generation of activated oxygen. *Arch. Biochem. Biophys.* **382**: 195-202.
6. Alam J, Killeen E, Gong P, Naquin R, Hu B, Stewart D, Ingelfinger JR, Nath KA. 2003. Heme activates the heme oxygenase-1 gene in renal epithelial cells by stabilizing Nrf2. *J. Biol. Chem.* **278**: 49246-49253.
7. Albores A, Koropatnick J, Cherian MG, Zelazowski AJ. 1992. Arsenic induces and enhances rat hepatic metallothionein production *in vivo*. *Chem. Biol. Interact.* **85**: 127-140.
8. Allen T, Singhal R, Rana SVS. 2004. Resistance to oxidative stress in a freshwater fish *Channa punctatus* after exposure to inorganic arsenic. *Biol. Trace Elem. Res.* **98**: 63-72.
9. Altikat S, Uysal K, Kuru HI, Kavasoglu M, Ozturk GN, Kucuk A. 2014. The effect of arsenic on some antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in various tissues of mirror carp (*Cyprinus carpio carpio*). *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* (Epub ahead of print)
10. Alvarez B, Demicheli V, Durán R, Trujillo M, Cerveñansky C, Freeman BA, Radi R. 2004. Inactivation of human Cu,Zn superoxide dismutase by peroxynitrite and formation of histidinyl radical. *Free Radic. Biol. Med.* **37**:813-22.
11. Aposhian HV. 1997. Enzymatic methylation of arsenic species and other new approaches to arsenic toxicity. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **37**: 397-419.
12. Arora A, Sairam RK, SriFetava GC. 2002. Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Curr. Sci.* **82**:1227-1238.
13. Ashkenazi A, Dixit VM. 1998. Death receptors: signaling and modulation. *Science* **281**:1305-1308.
14. Aw TY. 1994. Biliary glutathione promotes the mucosal metabolism of luminal peroxidized lipids by rat small intestine *in vivo*. *J. Clin. Invest.* **94**: 1218-1225.
15. Aw TY, Williams MW, Gray L. 1992. Absorption and lymphatic transport of peroxidized lipids by rat small intestine *in vivo*: role of mucosal GSH. *Am. J. Physiol.* **262**: 99-106.
16. Baboer BM. 1984. The respiratory burst of phagocytes. *J. Clin. Invest.* **73**: 599.
17. Balla G, Jacob HS, Balla J, Rosenberg M, Nath K, Apple F, Eaton JW, Vercellotti GM. 1992. Ferritin: a cytoprotective antioxidant strategem of endothelium. *J. Biol. Chem.* **267**:18148-18153.
18. Ballatori JF, Rebbeor. 1998. Roles of MRP2 and oatp1 in hepatocellular export of reduced glutathione. *Semin. Liver Dis.* **18**: 377-387.
19. Barañano DE, Wolosker H, Bae BI, Barrow RK, Snyder SH, Ferris CD. 2000. A mammalian iron ATPase induced by iron. *J. Biol. Chem.* **275**: 166-173.
20. Bears H, Richards JG, Schulte PM. 2006. Arsenic exposure alters hepatic arsenic species composition and stress mediated-gene expression in the common Killifish (*Fundulus heteroclitus*). *Aquat. Toxicol.* **77**: 257-266.
21. Beers RF, Sizer IW. 1953. Catalase assay with special reference to manometric methods. *Science* **117**: 710-712.
22. Bhor VM, Raghuram N, Sivakami S. 2004. Oxidative damage and altered antioxidant enzyme activities in the small intestine of streptozotocin-induced diabetic rats. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **36**: 89-97.

23. Binder CJ, Chang MK, Shaw PX, Miller YI, Hartvigsen K, Dewan A, Witztum JL. 2002. Innate and acquired immunity in atherogenesis. *Nat Med.* **8**: 1218-1226.
24. Blakytyn R, Harding JJ. 1992. Glycation (non-enzymatic glycosilation) inactivates glutathione reductase. *Biochem. J.* **288**: 303-307.
25. Blázovics A, Szentmihályi K, Fehér E. 2004. Alterations of redox-homeostasis in bowel parts. *Z. Gastroenterol.* 42-49.
26. Blough NV, Zafiriou OC. 1985. Reaction of superoxide with nitric oxide to form peroxonitrite in alkaline aqueous solution. *Inorg. Chem.* **24**: 3502-3504.
27. Bódi N, Battonyai I, Talapka P, Hermes E, Jancsó Zs, Katarova Z, Izbéki F, Wittmann T, Fekete É, Bagyánszki M. 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**: 316-326.
28. Borgwardt S. 1994. Entsiegelung in Straßenarum-Belastung von Grundwasser und Boden bei der Versickening Von Niederschlagen. *Korr. Abwasser.* **41**: 530-540.
29. Boullier A, Bird DA, Chang MK, Dennis EA, Friedman P, Gillotre-Taylor K, Hörkö S, Palinski W, Quehenberger O, Shaw P, Steinberg D, Terpstra V, Witztum JL. 2001. Scavenger receptors, oxidized LDL, and atherosclerosis. *Ann. NY Acad. Sci.* **947**:214-222.
30. Bray RC, Cockle SA, Fielden EM, Roberts PB, Rotilio G, Calabrese L. 1974. Reduction and inactivation of superoxide dismutase by hydrogen peroxide. *Biochem. J.* **139**:43-48.
31. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. 2001. *Nature* **414**: 813-820.
32. Brownlee M, Cerami A, Vlassara H. Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. 1988. *N. Eng. J. Med.* **318**: 1315-1321.
33. Breutler E. 1966. A series of new screening procedures for pyruvate kinase deficiency, glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, and glutathion reductase deficiency. *Blood* **28**: 553-562.
34. Bussolati B, Ahmed A, Pemberton H, Landis RC, Di Carlo F, Haskard DO, Mason JC. 2004. Bifunctional role for VEGF-induced heme oxygenase-1 *in vivo*: induction of angiogenesis and inhibition of leukocytic infiltration. *Blood* **103**: 761-766.
35. Cadenas E. 1989. Biochemistry of oxygen toxicity. *Ann. Rev. Biochem.* **58**: 79-110.
36. Cai L, Kang YJ. 2001. Metallothionein prevents diabetic cardiomyopathy. *Toxicol. Sci.* **60**:13.
37. Cao J, Drummond G, Inoue K, Sodhi K, Li XY, Omura S. 2008. Upregulation of heme oxygenase-1 combined with increased adiponectin lowers blood pressure in diabetic spontaneously hypertensive rats through a reduction in endothelial cell dysfunction, apoptosis and oxidative stress. *Int. J. Mol. Sci.* **9**: 2388-2406.
38. Casalino E, Sblano C, Landriscina C. Enzyme activity alteration by cadmium administration to rats: the possibility of iron involvement in lipid peroxidation. 1997. *Arch. Biochem. Biophys.* **346**: 171-179.
39. Chance B, Sies H, Boveris A. 1979. Hydroperoxyde metabolism in mammalian organs. *Phys. Rev.* **59**: 527-604.
40. Cohen SM, Arnold LL, Eldan M, Lewis AS, Beck BD 2006. Methylated arsenicals: the implications of metabolism and carcinogenicity studies in rodents to human risk assessment. *Crit. Rev. Toxicol.* **36**: 99-133.
41. Cosso L, Maineri EP, Traverso N, Rosatto N, Pronzato MA, Cottalasso D, Marinari UM, Odetti P. 2001. Induction od heme oxygenase 1 in liver of spontaneously diabetic rats. *Free Radic. Res.* **34**: 189-191.
42. Courtney AE, Maxwell A. 2008. 'Heme oxygenase 1: does it have a role in renal cytoprotection?' *Am. J. Kidney Dis.* **51**: 4.
43. Craft NE, Failla ML. 1983. Zinc, iron, and copper absorption in the streptozotocin-diabetic rat. *Am. J. Physiol.* **244**: 122-128.
44. Csathó P. 1994. A környezet nehézfém-szennyezettsége és az agrártermelés. MTA Talajtani és Agrokémiai Kutató Intézete. AKAPRINT, Budapest.

45. Cuypers A, Plusquin M, Remans T, Jozefczak M, Keunen E, Gielen H, Opdenakker K, Nair AR, Munters E, Artois TJ. 2010. Cadmium stress: An oxidative challenge. *Biometals* **23**: 927-940.
46. Dahm LJ, Jones DP. 1994. Secretion of cysteine and glutathione from mucosa to lumen in rat small intestine. *Am. J. Physiol.* **267**: 292-300.
47. de-Groot H, Anundi I, Littauer A. 1989. Hypoxia reoxygenation injury and the generation of reactive oxygen species in isolated hepatocytes. *Biomedica. Biochim. Acta* **48**: 511-515.
48. Das SK, Hiran KR, Mukherjee S, Vasudevan DM. 2007. Oxidative stress is the primary event: effects of ethanol consumption in brain. *Indian J. Clin. Biochem.* **22**: 99-104.
49. Deneke SM, Fanburg BL. 1989. Regulation of cellular glutathione. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* **257**: 163-173.
50. Dennery PA, Spitz DR, Yang G, Tatarov A, Lee CS, Shegog ML. 1998. Oxygen toxicity and iron accumulation in the lungs of mice lacking heme oxygenase-2. *J. Clin. Invest.* **101**: 1001-1011.
51. Dennery PA, Visner G, Weng Y, Nguyen X, Lu F, Zander D, Yang G. 2003. Resistance to hyperoxia with heme oxygenase-1 disruption: role of iron. *Free Radic. Biol. Med.* **34**: 124-133.
52. Dereeper A, Guignon V, Blanc G, Audic S, Buffet S, Chevenet F, Dufayard JF, Guindon S, Lefort V, Lescot M, Claverie JM, Gascuel O. 2008. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Res. W*: 465-469.
53. Díaz-Villaseñor A, Burns AL, Hiriart M, Cebrián ME, Ostrosky-Wegman P. 2007. Arsenic-induced alteration in the expression of genes related to type 2 diabetes mellitus. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **225**: 123-133.
54. Dolinay, T., Szilasi, M., Liu, M., and Choi, A. M. 2004. Inhaled carbon monoxide confers antiinflammatory effects against ventilator-induced lung injury. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* **170**: 613-620.
55. Dore S, Takahashi M, Ferris CD, Zakhary R, Hester LD, Guastella D, Snyder SH. 1999. Bilirubin, formed by activation of heme oxygenase-2, protects neurons against oxidative stress injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 2445-2450.
56. Dormandy TL. 1978. Free-radical oxidation and antioxidants. *Lancet* **311**: 647-650.
57. Eller-Jessen K, Crivello JF. 1998. Subcutaneous NaAs<sup>3+</sup> exposure increases metallothionein mRNA and protein expression in juvenile winter flounder. *Aquat. Toxicol.* **42**: 301-320.
58. Ercal N, Gurer-Orhan H, Aykin-Burns N. 2001. Toxic metals and oxidative stress part 1: mechanisms involved in metal induced oxidative damage. *Curr. Top. Med. Chem.* **1**: 529-539.
59. Failla ML, Kiser RA. 1981. Altered tissue content and cytosol distribution of trace metals in experimental diabetes. *J. Nutr.* **11**: 1900-1909.
60. Flohé R, Günzler WA, Shoch HH. 1973. Glutathion peroxidase: selenoenzyme. *FEBS Lett.* **32**: 132.
61. Flora SJ. 1999. Arsenic-induced oxidative stress and its reversibility following combined administration of N-acetylcysteine and meso 2,3-dimercaptosuccinic acid in rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **26**: 865-869.
62. Fowler BA, Hildebrand CE, Kojima Y, Webb M. 1987. Nomenclature of Metallothionein. *Experientia* **52**: 19-22.
63. Freeman BA, Crapo JD. 1982. Biology of disease. Free radicals and tissue injury. *Lab. Invest.* **47**: 412-426.
64. Fridovich I. 1983. Superoxide radical: An endogenous toxicant. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **23**: 239-257.
65. Fridovich I. 1989. Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas. *J. Biol. Chem.* **264**: 7761-7764.
66. Gerschman R, Gilbert DL, Nye SW, Dwyer P, Fenn WO. 1954. Oxygen poisoning and x-irradiation-A mechanism in common. *Science* **119**: 623-626.

67. Gibbons SJ, Farrugia G. 2004. The role of carbon monoxide in the gastrointestinal tract. *J. Physiol.* **556**: 325-336.
68. Gilbert DL (ed.) 1981. Perspective on the history of oxygen and life. In: Oxygen and the Living Process: An Inter-disciplinary Approach. Springer Verlag, New York, 1-43.
69. Gong P, Chen FX, Ma GF. 2008. Endomorphin 1 effectively protects cadmium chloride-induced hepatic damage in mice. *Toxicology* **251**: 35-44.
70. Green K, Brand MD, Murphy MP 2004. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. *Diabetes* **53**: 110-118.
71. Grisham MB. 1996. Quantitation of nitrate and nitrite in extracellular fluids. *Methods Enzymol.* **268**: 237-246.
72. Gurr JR, Liu F, Lynn S, Jan KY. 1998. Calcium-dependent nitric oxide production is involved in arsenite-induced micronuclei. *Mutat Res.* **416**: 137-48.
73. Guzik TJ, Mussa S, Gastaldi D, Sadowski J, Ratnatunga C, Pillai R, Channon CM. 2002. Mechanisms of increased vascular superoxide production in human diabetes mellitus. Role of NAD(P)H oxidase and endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* **105**: 1656-1662.
74. Halliwell B. 1994. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet.* **344**: 721-724.
75. Halliwell B, Gutteridge JMC. 1995. The definition and measurement of antioxidants in biological-systems. *Free Rad. Biol. Med.* **18**: 125-126.
76. Halliwell B, Gutteridge JMC. 1999. Free radicals in biology and medicine. Third edition, Clarendon Press, Oxford, UK.
77. Hamer DH. 1986. Metallothionein. *Annu. Rev. Biochem.* **55**: 913-951.
78. Hansen BH, Romma S, Garmo QA, Olsvik PA, Andersen RA. 2006. Antioxidative stress proteins and their gene expression in brown trout (*Salmo trutta*) from three rivers with different heavy metal levels. *Comp. Biochem. Physiol. C* **143**: 263-274.
79. Hansson GK, Libby P, Schönbeck U, Yan ZQ. 2002. Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis. *Circ. Res.* **91**: 281-291.
80. Harman D. 1956. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* **11**: 298-300.
81. Herak-Kramberger CM, Brown D, Sabolic I. 1998. Cadmium inhibits vacuolar H(+)-ATPase and endocytosis in rat kidney cortex. *Kidney Int.* **53**: 1713-1726.
82. Hisar O, Yildirim S, Sonmez AY, Aras HN, Gultepe N. 2009. Changes in liver and kidney antioxidant enzyme activities in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed cadmium. *Asian J. Chem.* **21**: 3133-3137.
83. Huie R.E., Padmaja S. 1993. The reaction of NO and superoxide. *Free Radic. Res. Commun.* **18**: 195-199.
84. Hunkar T, Aktan F, Ceylan A, Karasu C. 2002. Effects of cod liver oil on tissue antioxidant pathways in normal and streptozotocin-diabetic rats. *Cell. Biochem. Funct.* **20**: 297-302.
85. Hunt JV, Smith CCT, Wolf SP. 1990. Autoxidative glycosylation and possible involvement of peroxides and free radicals in LDL modification by glucose. *Diabetes* **39**: 1420-1424.
86. Immenschuh S, Ramadori G. 2000. Gene regulation of heme oxygenase-1 as a therapeutic target. *Biochem. Pharmacol.* **60**: 1121-1128.
87. Izbéki F, Wittman T, Rosztóczy A, Linke N, Bódi N, Fekete E, Bagyánszki M. 2008. Immediate insulin treatment prevents gut motility alterations and loss of nitrergic neurons in the ileum and colon of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **80**: 192-198.
88. Jabeen G, Javed M, Azmat H. 2012. Assessment of Heavy Metals in the Fish Collected from the River Ravi, Pakistan. *Pak. Vet. J.* **32**: 107-111.
89. Järup L. 2003. Hazards of heavy metal contamination. *Br. Med. Bull.* **68**: 167-182.
90. Järup L, Akesson A. 2009. Current status of cadmium as an environmental health problem. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **238**: 201-208.

91. Jiang G, Gong Z, Li XF, Cullen WR, Le XC. 2003. Interaction of trivalent arsenicals with metallothionein. *Chem. Res. Toxicol.* **16**: 873-880.
92. Ji LL, Hollander J. 2000. Antioxidant defence: effects of aging and exercise. In: Z Radak, ed. *Free Radicals in Exercise and Ageing*. Champaign Illinois, USA: Human Kinetics.
93. Johansen JS, Harris AK, Rychly DJ, Ergul A. 2005. Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: linking basic science to clinical practice. *Cardiovasc. Diabetol.* **4**: 5.
94. Jones DP. 2002. Redox potential of GSH/GSSG couple: assay and biological significance. *Methods Enzymol.* **348**: 93-112.
95. Jorgensen M, Grrasvik BE, Hamrec K, Goksny PA. 1998. Induction of heme oxygenase in fish by heavy metals, phenylhydrazine and high lipid diets. *Marine Environ. Res.* **46**: 559-561.
96. Jurczuk M, Brzoska MM, Moniuszko-Jakoniuk J. 2004. Antioxidant enzymes activity and lipid peroxidation in liver and kidney of rats exposed to cadmium and ethanol. *Food Chem. Toxicol.* **42**: 429-438.
97. Kagi JHR, Himmelhoch SR, Whanger PD, Bethune JL, Vallee BL. 1974. Equine hepatic and renal metallothionein 2. *Biol. Chem.* **249**: 3537-3542.
98. Kaplowitz N, Aw TY, Ookhtens M. 1985. The regulation of hepatic glutathione. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **25**: 715-744.
99. Karuppasamy R. 2004. Evaluation of Hg concentration in the tissue of fish, *Channa punctatus* (Bloch.) in relation to short and long-term exposure to phenyl mercuric acetate. *J. Plat. Jubilee A.U* **40**: 197-204.
100. Kedziora-Kornatowska K, Szram S, Kornatowski T, Szadujkis-Szadurski L, Kedziora J, Bartosz G. 2003. Effect of vitamin E and vitamin C supplementation on antioxidative state and renal glomerular basement membrane thickness in diabetic kidney. *Nephron Exp. Nephrol.* **95**: 134-143.
101. Kenyon EM, Del Razo LM, Brown JL, Anderson WA, Hughes MF, Kitchin KT. (1999). Metabolism and disposition of arsenite (AsIII) and its relationships to heme-oxygenase (HO) induction in mice. *Toxicologist* **48**: 222.
102. Kitchin KT, Ahmad S. 2003. Oxidative stress as a possible mode of action for arsenic carcinogenesis. *Toxicol. Lett.* **137**: 3-13.
103. Kono Y, Fridovich I. 1982. Superoxide radical inhibits catalase. *J. Biol. Chem.* **257**: 5751.
104. Kutty RK, Maines MD. 1984. "Effects of induction of heme oxygenase by cobalt and tin on the *in vivo* degradation of myoglobin." *Biochem. Pharmacol.* **33**: 2924-2926.
105. Lee HC, Hon T, Lan C, Zhang L. 2003. Structural environment dictates the biological significance of heme-responsive motifs and the role of Hsp90 in the activation of the heme activator protein Hap1. *Mol. Cell. Biol.* **23**: 5857-5866.
106. Leslie EM, Haimeur A, Waalkes MP. 2004. Arsenic transport by the human multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1). Evidence that a tri-glutathione conjugate is required. *J. Biol. Chem.* **279**: 32700-32708.
107. Liang Q1, Carlson EC, Donthi RV, Kralik PM, Shen X, Epstein PN. 2002. Overexpression of metallothionein reduces diabetic cardiomyopathy. *Diabetes* **51**: 174-181.
108. Lieberthal W, Levine JS. 1996. Mechanisms of apoptosis and its potential role in renal tubular epithelial cell injury. *Am. J. Physiol.* **271**: 477-488.
109. Lindahl T. 1982. DNA repair enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* **51**: 61.
110. Lin Q, Weis S, Yang G, Weng YH, Helston R, Rish K, Smith A, Bordner J, Polte T, Gaunitz F, Dennery PA. 2007. Heme oxygenase-1 protein localizes to the nucleus and activates transcription factors important in oxidative stress. *J. Biol. Chem.* **282**: 20621-20633.
111. Liu SX, Athar M, Lippai I, Waldren C, Hei TK. 2001. Induction of oxyradicals by arsenic: implication for mechanism of genotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**: 1643-1648.
112. Livak KJ and Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $[\Delta\Delta CT]$  method. *Methods* **25**: 402-408.

113. Li Volti G, Murabito P. 2014. Pharmacologic induction of heme oxygenase-1: It Is Time to Take It Seriously Critical. *Care Med.* **42**: 1967-1968.
114. Lopez-Barea J, Lee CV. 1979. Mouse-liver glutathion-reductase. *Eur. J. Biochem.* **98**: 487.
115. Louma SN. 1983. Bioavailability of trace metals to aquatic organisms – a review. *Sci. Total Environ.* **28**: 1-22.
116. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265.
117. Luhtala TA, Roecker EB, Pugh T, FeuersRJ, Weindruch R. 1994. Dietary restriction attenuates age-related increases in rat skeletal muscle antioxidant enzyme activities. *J. Gerontol.* **49**: 231-238.
118. Lynn S, Gurr JR, Lai HT, Jan KY. 2000. NADH oxidase activation is involved in arsenite-induced oxidative DNA damage in human vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* **85**: 514-519.
119. MacMillan-Crow LA, Crow JP, Thompson JA. 1998. Peroxynitrite-mediated inactivation of manganese superoxide dismutase involves nitration and oxidation of critical tyrosine residues. *Biochemistry* **37**: 1613-1622.
120. Maines MD. 1997. The heme oxygenase system: A regulator of second messenger gases. *Ann. Rev. Pharmacol.* **37**: 517-554.
121. Maines MD. 2005. The heme oxygenase system: update 2005. *Antioxid. Redox Signal.* **7**: 1761-1766.
122. Maines MD, Trakshel GM, Kutty RK. 1986. Characterization of two constitutive forms of rat liver microsomal heme oxygenase. Only one molecular species of the enzyme is inducible. *J. Biol. Chem.* **261**: 411.
123. Maitani T, Saito N, Abe M, Uchiyama S, Saito Y. 1987. Chemical form-dependent induction of hepatic zinc-thionein by arsenic administration and effect of co-administered selenium in mice. *Toxicol. Lett.* **39**: 63-70.
124. Maiti S, Chatterjee AK. 2001. Effects on levels of glutathione and some related enzymes in tissues after an acute arsenic exposure in rats and their relationship to dietary protein deficiency. *Arch. Toxicol.* **75**: 531-537.
125. Maiti S, Chatterjee AK. 2000. Differential response of cellular antioxidant mechanism of liver and kidney to arsenic exposure and its relation to dietary protein deficiency. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **8**: 227-235.
126. Maritim A, Sanders R, Watkins JI. 2003. Effects of alpha-lipoic acid on biomarkers of oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Nutr. Biochem.* **14**: 288-294.
127. Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB. 2003. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: A review. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **17**: 24-38.
128. Marklund SL. 1982. Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**: 7634-7638.
129. Marks GS, Brien JF, Nakatsu K, McLaughlin BE. 1991. Does carbon monoxide have a physiological function? *Trends Pharmacol. Sci.* **12**: 185-188.
130. Matkovics B, Kotorman M, Varga SzI, Quy Hai D, Varga Cs. 1997/98. Oxidative stress in experimental diabetes induced by streptozotocin. *Acta Physiol. Hung.* **85**: 183-192.
131. Matkovics B, Varga Sz I, Szabo L, Witas H. 1982. The effect of diabetes on the activities of the peroxide metabolism enzymes. *Horm. Metab. Res.* **14**: 77-79.
132. Masella R, Di Benedetto R, Vari R, Filesi C, Giovannini C. 2005. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J. Nutr. Biochem.* **16**: 577-586.
133. McCord JM, Fridovich I. 1969. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* **244**: 6049-6055.
134. McFadden SL, Ohlemiller KK, Ding D, Shero M, Salvi RJ. 2001. The Influence of Superoxide Dismutase and Glutathione Peroxidase Deficiencies on Noise-Induced Hearing Loss in Mice. *Noise Health.* **3**: 49-64.



135. Menconi MJ, Unno N, Smith M, Aguirre DE, Fink MP. 1998. Nitric oxide donor-induced hyperpermeability of cultured intestinal epithelial monolayers: role of superoxide radical, hydroxyl radical, and peroxynitrite. *Biochim. Biophys. Acta.* **1425**: 189-203.
136. Mene P, Pascale C, Teti A, Bernardini S, Cinotti GA, Pugliese F. 1999. Effects of advanced glycation end products on cytosolic Ca signaling of cultured human mesangial cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* **10**: 1478-1486.
137. Miller WH Jr1, Schipper HM, Lee JS, Singer J, Waxman S. 2002. Mechanisms of action of arsenic trioxide. *Cancer Res.* **62**: 3893-3903.
138. Misra HP, Fridovich I. 1972. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* **247**: 3170-3175.
139. Mittal CK, Murard F. 1977. Activation of guanylate cyclase by superoxide dismutase and hydroxyl radical: a physiological regulator of guanosine 3',5'-monophosphate formation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**: 4360-4364.
140. Moncada S, Higgs A. 1993. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N. Engl. J. Med.* **329**: 2002-2012.
141. Mukherjee B, Mukherjee JR, Chatterjee M. 1994. Lipid peroxidation, glutathione levels and changes in glutathione related enzyme activities in streptozotocin induced diabetic rats. *Imm. Cell. Biol.* **72**: 109-114.
142. Mzimela HM, Wepener V, Cyrus DP. 2003. Seasonal variation of selected metals in sediments, water and tissues of the groovy mullet, *Liza dumerelii* (*Mugilidae*) from the Mhlathuze Estuary, South Africa. *Marine Poll. Bull.* **46**: 659-664.
143. Nath KA. 2006. Heme oxygenase-1: a provenance for cytoprotective pathways in the kidney and other tissues. *Kidney Int.* **70**: 432.
144. National Academy of Sciences. Arsenic in drinking water. Washington, DC: National Academies Press; 2001:91
145. Navas-Acien A, Silbergeld EK, Streeter RA, Clark JM, Burke TA, Guallar E. 2006. Arsenic Exposure and Type 2 Diabetes: A Systematic Review of the Experimental and Epidemiologic Evidence. *Environ. Health Perspect.* **114**: 641-648.
146. Nawrot TS, Van Hecke E, Thijs L, Richart T, Kuznetsova T, Jin Y. 2008. Cadmium-related mortality and long-term secular trends in the cadmium body burden of an environmentally exposed population. *Environ. Health Perspect.* **116**: 1620-1628.
147. Ngu TT, Stillman MJ. 2006. Arsenic binding to human metallothionein. *J. Am. Chem. Soc.* **128**: 12473-12483.
148. Nicotera P, Orrenius S. 1986. Role of thiols in protection against biological reactive intermediates. *Adv. Exp. Med. Biol.* **197**: 41-51.
149. Niedowicz DM, Daleke DL. 2005. The role of oxidative stress in diabetic complications. *Cell. Biochem. Biophys.* **43**: 289-330.
150. Nielson KB, Winge DR. 1983. Order of metal binding in metallothionein. *J. Biol. Chem.* **258**: 13063-13069.
151. Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, Yorek MA, Beebe D, Oates PJ, Hammes HP, Giardino I, Brownlee M. 2000. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* **404**: 787-790.
152. Novák Z, Kovács L, Pál A, Pataki L, Varga SzI, Matkovics B. 1990. Comparative study of antioxidant enzymes and lipid peroxidation in cord maternal red blood cells. *Acta Pediat. Hung.* **30**: 391-397.
153. Obaiah Jamakala, Rani UA. 2012. Protective role of trace elements against cadmium induced alterations in the selected oxidative stress enzymes in liver and kidney of fresh water teleost, *Oreochromis Mossambicus* (tilapia). *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* **4**: 975-1491.
154. Ohno S, Muramoto J, Christian L, Atkin NB. 1967. Diploid-tetraploid relationship among Old World members of the fish family *Cyprinidae*. *Chromosoma* **23**: 1-9.
155. Oladimeji AA (1985). An arsenic-binding protein in rainbow trout. *Ecotoxicol. Environ. Safety* **9**: 1-5.

156. Oost RVD, Beyer J, Vermeulen NPE. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **13**: 57-149.
157. Ossola JO, Tomaro ML; Kitchin KT, Del Razo LM, Brown JL, Anderson WL, Kenyon EM. 1999. An integrated pharmacokinetic and pharmacodynamic study of arsenite action. 1. Heme oxygenase induction in rats. *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.* **19**: 385-402.
158. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. 2007. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev.* **87**: 315-424.
159. Parolin MB, Reason IJ. 2001. Apoptosis as a mechanism of tissue injury in hepatobiliary diseases. *Arq. Gastroenterol.* **38**: 138-44.
160. Pedlar RM, Ptashynski MD, Evans R, Klaverkamp JF. 2002. Toxicological effects of dietary arsenic exposure in lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*). *Aquat. Toxicol.* **57**: 167-189.
161. Peraza MA, Ayala-Fierro F, Barber DS, Casarez E, Rael LT. 1998. Effect of micronutrients on metal toxicity. *Environ. Health. Perspect.* **106**: 203-216.
162. Phillips DJH. 1990. Arsenic in aquatic organisms, a review, emphasizing chemical speciation. *Aquat. Toxicol.* **16**: 151-186.
163. Piepoli AL, de Salvatore G, Lemoli M, de Benedictis L, Mitolo-Chieppa D, de Salvia MA. 2008. Modulation of heme oxygenase/carbon monoxide system affects the inhibitory neurotransmission involved in gastrointestinal motility of streptozotocin-treated diabetic rats. *Neurogastroenterol. Motil.* **20**: 1251-1262.
164. Pimstone NR, Tenhunen R, Seitz PT, Marver HS, Schmid R. 1971. The enzymatic degradation of hemoglobin to bile pigments by macrophages. *J. Exp. Med.* **133**: 1264-1281.
165. Placer ZA, Cushman L, Johnson SC. 1966. Estimation of product of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biochemical systems. *Anal. Biochem.* **16**: 359-364.
166. Pugliese G, Pricci F, Romeo, Pugliese F, Mene P, Giannini S, Cresci B, Galli G, Rotella CM, Vlassara H, Di Mario U. 1997. Upregulation of mesangial growth factor and extracellular matrix synthesis by advanced glycation end products via a receptor-mediated mechanism. *Diabetes* **46**: 1881-1887.
167. Qi Z, Hamza I, O'Brian MR. 1999. Heme is an effector molecule for iron-dependent degradation of the bacterial iron response regulator (Irr) protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 13056-13061.
168. Quaife CJ, Findley SD, Erickson JC, Froelick GJ, Kelly EJ, Zambrowicz BP, Palmiter RD. 1994. Induction of a new metallothionein isoform (MT-IV) occurs during differentiation of stratified squamous epithelia. *Biochemistry* **33**: 7250-7259.
169. Rachmilewitz D, Stamler JS, Karmeli F, Mullins ME, Singel DJ, Loscalzo J, Xavier RJ, Podolsky DK. 1993. Peroxynitrite-induced rat colitis-a new model of colonic inflammation. *Gastroenterology* **105**: 1681-1688.
170. Radhakrishnan MV. 2009. Effect of cadmium on catalase activity in four tissues of fresh water fish *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *Int. J. Vet. Med.* 1937-1965.
171. Rauscher F, Sanders R, Watkins JI. 2001. Effects of coenzyme Q10 treatment on antioxidant pathways in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **15**: 41-46.
172. Retsky KL, Freeman MW, Frei B. 1993. Ascorbic-acid oxidation product(s) protect human low-density-lipoprotein against atherogenic modification-Antioxidant rather than prooxidant activity of vitamin-c in the presence of transition-metal ions. *J. Biol. Chem.* **268**: 1304-1309.
173. Reynolds ES. 1963. The use of lead citrate as an electron dense stain in electronmicroscopy. *J. Cell. Biol.* **17**: 208-212.
174. Rouault TA. 2009. Cell biology. An ancient gauge for iron. *Science* **326**: 676-677.
175. Roy S, Bhattacharya S. 2006. Arsenic-induced histopathology and synthesis of stress proteins in liver and kidney of *Channa punctatus*. *Ecotoxicol. Environ. Safety* **65**: 218-229.
176. Ryter SW, Alam J, Choi AM. 2006. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. *Physiol. Rev.* **86**: 583-650.

177. Sabolić I, Breljak D, Skarica M, Herak-Kramberger CM. 2010. Role of metallothionein in cadmium traffic and toxicity in kidneys and other mammalian organs *Biometals* **23**: 897-926.
178. Sanders LM, Henderson CE, Hong MY, Barhoumi R, Burghardt RC, Carroll RJ, Turner ND, Chapkin RS, Lupton JR. 2004. Pro-oxidant environment of the colon compared to the small intestine may contribute to greater cancer susceptibility. *Cancer Lett.* **208**: 155-161.
179. Sandoval M, Liu X, Mannick EE, Clark DA, Miller MJ. 1997. Peroxynitrite-induced apoptosis in human intestinal epithelial cells is attenuated by mesalamine. *Gastroenterol.* **113**: 1480-1488.
180. Scott N, Hattelid KM, Mackenzie NE. 1993. Reaction of arsenic (III) and arsenic (V) species with glutathione. *Chem. Res. Tox.* **6**: 102-106.
181. Schafer FQ, Buettner GR. 2001. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Rad. Biol. Med.* **30**: 1191-1212.
182. Sedlak J, Lindsay RH. 1968. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal. Biochem.* **25**: 192-205.
183. Seok Ho Cha, Chang Kook Suh. 2010. Heme oxygenase-1 mediated protective effect of methyl gallate on cadmium-induced cytotoxicity in cultured mouse mesangial cells. *Mol. Cell. Toxicol.* **6**: 127-133.
184. Shi H, Shi X, Liu KJ. 2004. Oxidative mechanism of arsenic toxicity and carcinogenesis. *Mol. Cell. Biochem.* **255**: 67-78.
185. Shibahara S, Han F, Li B, Takeda K. 2007. Hypoxia and heme oxygenases: oxygen sensing and regulation of expression. *Antioxid. Redox Signal.* **9**: 2209-2225.
186. Sharma SS, Dietz KJ. 2008. The relationship between metal toxicity and cellular redox tolerance. *Trends Plant Sci.* **14**: 43-50.
187. Sies, H. 1985. Oxidative Stress (ed. H. Sies). London: Academic Press
188. Sikorski EM, Hock T, Hill Kapturczak N, Agarwal A. 2004. The story so far: Molecular regulation of the heme oxygenase-1 gene in renal injury. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* **286**: 425-441.
189. Squadrone S, Prearo M, Brizio P, Gavinelli S, Pellegrino M, Scanzio T, Guarise S, Benedetto A, Abete MC. 2012. Heavy metals distribution in muscle, liver, kidney and gill of European catfish (*Silurus glanis*) from Italian Rivers. *Chemosphere* **90**, 358-365.
190. Sumimoto H. 2008. Structure, regulation and evolution of Nox-family NADPH oxidases that produce reactive oxygen species. *FEBS J.* **275**: 3249-77.
191. Suttner DM, Dennery PA. 1999. Reversal of HO-1 related cytoprotection with increased expression is due to reactive iron. *FASEB J.* **13**: 1800-1809.
192. Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh A, Glazer A, Ames BN. 1987. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science* **235**: 1043-1045.
193. Szabó Cs. 2003. Multiple pathways of peroxynitrite cytotoxicity. *Toxicol. Lett.* **140**: 105-112.
194. Talas ZS, Orun I, Ozdemir I, Erdogan K, Alkan A, Yilmaz I. 2008. Antioxidative role of selenium against the toxic effect of heavy metals (Cd<sup>2+</sup>, Cr<sup>3+</sup>) on liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792). *Fish Physiol. Biochem.* **34**: 217-222.
195. Tenhunen R, Marver HS, Schmid R. 1970. The enzymatic catabolism of hemoglobin: stimulation of microsomal heme oxygenase by hemin. *J. Lab. Clin. Med.* **75**: 410-421.
196. Thevenod F (2003) Nephrotoxicity and the proximal tubule: insights from cadmium. *Nephron Physiol.* **93**: 87-93.
197. Thevenod F. 2009. Cadmium and cellular signaling cascades: To be or not to be? *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **238**: 221-239.
198. Thomas P, Wofford HW. 1984. Effects of metals and organic compounds on hepatic glutathione, cysteine and acid soluble thiol levels in mullet (*Mugil cephalus*). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **76**: 172-182.
199. Thornberry NA, Lazebnik Y. 1998. Caspases: enemies within. *Science* **281**: 1312-1316.

200. Tietze F. 1969. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione. Applications to mammalian blood and other tissues. *Anal. Biochem.* **27**: 502-522.
201. Tsai PH, Liu JJ, Chiu WC, Pai MH, Yeh SL. 2011. Effects of dietary glutamine on adhesion molecule expression and oxidative stress in mice with streptozotocin-induced type 1 diabetes. *Clin. Nutr.* **30**: 124-129.
202. Turko IV, Marcondes S, Murad F 2001. Diabetes-associated nitration of tyrosine and inactivation of succinyl-CoA:3-oxoacid CoA-transferase. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **281**: 2289-2294.
203. Uchida Y, Takio K, Titani K, Ihara Y, Tomonaga M. 1991. The growth inhibitory factor that is deficient in the Alzheimer's disease brain is a 68 amino acid metallothionein-like protein. *Neuron* **72**: 337-347.
204. Uriu Hare JY, Stem JS, Keen CL. 1988. The effect of diabetes on the molecular localization of maternal and fetal zinc and copper metalloprotein in the rat. *Biol. Trace Elem. Res.* **18**: 71-79.
205. Vahidnia AI, van der Voet GB, de Wolff FA. 2007. Arsenic neurotoxicity-a review. *Hum. Exp. Toxicol.* **26**: 823-382.
206. Vairavamurthy MA, Goldenber WS, Ouyang S. 2000. The interaction of hydrophilic thiols with cadmium: investigation with a simple model, 3-mercaptopropionic acid. *Mar. Chem.* **70**: 181-189.
207. VanDyke K, Ghareeb E, VanDyke M. 2008. Luminescence experiments involved in the mechanism of streptozotocin diabetes and cataract formation. *Luminescence* **23**: 386-391.
208. Velez-Alvarez M, Labrada-Martagon V, Mendez-Rodriguez LC, Galvan-Magana F, Zenteno-Savin F. 2013. Oxidative stress indicators and trace element concentrations in tissues of mako shark (*Isurus oxyrinchus*). *Comp. Biochem. Physiol Part A Mol. Integr. Physiol.* **165**: 508-514.
209. Verma A, Hirsch DJ, Glatt CE, Ronnett GV, Snyder SH. 1993. Carbon monoxide: a putative neural messenger. *Science* **259**: 381-384.
210. Villegas E, Gilliland SE. 1998. Hydrogen peroxide production by *Lactobacillus delbrueckii Subsp. Lactis* I at 5°C. *J. Food Sci.* **63**: 1070-1074.
211. Vranová E, Inzé D, Breusegem FV. 2002. Signal transduction during oxidative stress. *J. Exp. Bot.* **53**: 1227-1236.
212. Waeytens A, De Vos M, Laukens D 2009. Evidence for a potential role of metallothioneins in inflammatory bowel diseases. *Mediators Inflamm.* 729172
213. Waalkes MP, Poirier LA. 1984. In vitro cadmium-DNA interactions: cooperativity of cadmium binding and competitive antagonism by calcium, magnesium, and zinc. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **75**: 539-546.
214. Wagener FA, Volk HD, Willis D, Abraham NG, Soares MP, Adema GJ, Figdor CG. 2003. Different faces of the heme-heme oxygenase system in inflammation. *Pharmacol. Rev.* **55**: 551-571.
215. Walsh SW. 1997. The role of oxidative stress and antioxidants in preeclampsia. *Contemporary OB/GYN* **42**: 113-124.
216. Wang D, Zhong XP, Qiao ZX, Gui JF. 2008. Inductive transcription and protective role of fish heme oxygenase-1 under hypoxic stress. *J. Exp. Biol.* **211**: 2700-2706.
217. Wang TS, Kuo CF, Jan KY. 1996. Arsenite induces apoptosis in Chinese hamster ovary cells by generation of reactive oxygen species. *Cell Physiol.* **169**: 256-268.
218. Wang Y; Fang J; Leonard SS; Rao KM. 2004. Cadmium inhibits the electron transfer chain and induces reactive oxygen species. *Free Radic. Biol. Med.* **36**: 1434-1443.
219. Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thompson CB, Korsmeyer SJ. 2001. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* **292**: 727-730.
220. Weisiger RA, Fridovich I. 1973. Mitochondrial superoxide dismutase. Site of synthesis and intramitochondrial localization. *J. Biol. Chem.* **248**: 4793-4796.
221. Wild S, Roglic G, Green A 2004. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* **27**: 1047-1053.

222. Winterbourn CC. 2008. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nat. Chem. Biol.* **4**: 278-286.
223. Wrobel K, Wrobel K, Parker B, Kannamkumarath S, Sand Caruso JA. 2002. Determination of As (III), As (V), monomethylarsonic acid, dimethylarsinic acid and arsenobetaine by HPLC-ICP-MS: analysis of reference materials, fish tissues and urine. *Talanta* **58**: 899-907.
224. Wronska-Nofer T, Wisniewska-Knypl J, Dziubaltowska E. 1999. Prooxidative and genotoxic effect of transition metals (cadmium, nickel, chromium, and vanadium) in mice. *Trace Elem Electrol* **16**: 87-92.
225. Wunder C, Potter RF. 2003. The heme oxygenase system: its role in liver inflammation. *Curr. Drug Targets Cardiovasc. Haematol. Disord.* **3**: 199-208.
226. Yamanaka K, Hasegawa A, Sawamura R, Okada S. 1989. Dimethylated arsenics induce DNA strand breaks in lung via the production of active oxygen in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **165**: 43-50.
227. Yang J, Cherian MG. 1994. Protective effects of metallothionein on streptozotocin-induced diabetes in rats. *Life Sci.* **55**: 43-51.
228. Yang J, Panek HR, O'Brian MR. 2006. Oxidative stress promotes degradation of the Irr protein to regulate haem biosynthesis in *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol. Microbiol.* **60**: 209-218.
229. Yi L, Ragsdale SW. 2007. Evidence that the heme regulatory motifs in heme oxygenase-2 serve as a thiol/disulfide redox switch regulating heme binding. *J. Biol. Chem.* **282**: 21056-21067.
230. Zalups RK, Ahmad S (2003) Molecular handling of cadmium in transporting epithelia. *Toxicol. Appl. Pharm.* **186**: 163-188.
231. Zalups RK, Koropatnick DJ. 2000. Toxic and essential metals in the cellular response to signals, in: *Mol biol and tox of metals* (ed Koropatnik and Zalpus)
232. Zhang B, Georgiev O, Hagmann M, Günes Ç, Cramer M, Faller P, Vasák M, Schaffner W. 2003. Activity of metal-responsive transcription factor 1 by toxic heavy metals and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> *in vitro* is modulated by metallothionein. *Mol. Cell. Biol.* **23**: 8471-8485.

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton mondok köszönetet

Dr. Hermes Edit egyetemi docensnek, témavezetőmnek, amiért irányította, tanácsaival segítette kutatásaimat, dolgozatom elkészüléséhez felbecsülhetetlen és nélkülözhetetlen segítséget nyújtott, és végtelen türelemmel állt mellettem,

Dr. Boros Imre tanszékvezető egyetemi tanárnak, amiért helyet biztosított számomra a Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszéken kísérleteim elvégzéséhez,

Dr. Szöllősiné Dr. Varga Ilona egyetemi docensnek hasznos tanácsaiért,

Dr. Ferencz Ágnesnek, Lázár Renátának, Dugmonits Krisztina Nikolettának a kísérletekben nyújtott segítségükért és a mindennapi vidám hangulatért,

Dr. Fekete Éva egyetemi tanárnak és Dr. Bódi Nikolettnek a diabéteszes kísérletben nyújtott segítségért,

F. Vadadiné Erzsinek a technikai segítségért,

Hálás vagyok Édesanyámnak és az egész családomnak, akik mindenben támogattak, mellettem álltak, bíztattak.