

A májfunkció vizsgálata respirometriával

Examination of liver mitochondria with respirometry

STRIFLER GERDA, MÉSZÁROS ANDRÁS, PÉCZ DANIELLA, FICZERE ÁGNES, BARÁTH BÁLINT,
BOROS MIHÁLY, HARTMANN PETRA[@]

Szegedi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Sebészeti Műtéttani Intézet, Szeged
(tanszékvezető: Dr. Boros Mihály)

A mitochondriumok kulcsfontosságú élettani feladataiknál fogva oki szerepet játszanak számos akut és krónikus májbetegség kialakulásában, így e sejtközpontok terápiai és lehetséges diagnosztikus célpontok is egyben. Jelen tanulmányunk során bemutatunk egy vizsgálómódszert, amely nagy felbontású respirométer (oxigráf) segítségével lehetővé teszi a mitochondrialis funkciók értékelését. A vizsgálatok során friss szövetminták oxigénfogyasztásának meghatározása alapján az oxidatív foszforilációt és a mitochondrialis légzési lánc működését nagy pontossággal, valós időben lehet vizsgálni. A respirometriás módszer lehetőséget adhat a műtét előtt vagy alatt vett biopsziákból a májmitochondriumok funkcionális vizsgálatára is, így hozzájárulhat a sebészeti beavatkozások hatékonyságának növeléséhez.

Kulcsszavak: mitochondrium, ischaemia/reperfúzió, respirometria, patkány

Due to their diverse physiological functions, mitochondria can cause various acute and chronic liver diseases, thus being potential targets for therapies and diagnostics as well. In this study, the advantages of high-resolution respirometry are presented for the assessment of liver mitochondrial functions. During respirometry, the mitochondrial electron transport, the oxidative phosphorylation and the efficacy of the ADP synthesis can be calculated on the basis of oxygen consumption of freshly-taken tissue samples. Respirometry is a robust tool for the pre- or intraoperative analysis of liver mitochondrial functions and may increase the effectiveness of surgical interventions.

Keywords: mitochondria, ischemia/reperfusion, respirometry, rat

Beérkezett: 2016. április 25.; *elfogadva:* 2016. június 6.

Bevezetés

A májfunkciók műtét előtti értékelése a sebészi kockázat-elemzés fontos eleme, intraoperatív körülmények között pedig információt nyújthat az éppen történő metszés határának vagy a transzplantálhatóság megítélésének szempontjából is. A jelenleg használt funkcionális módszerek közé főként biokémiai tesztek, képalkotó és szövettani eljárások tartoznak.¹ A rutin-laborvizsgálatok során végzett májfunkciós tesztek (például az alanin- és aszpartát-aminotranszferáz enzim szintjének meghatározása) specificitása és érzékenysége kielégítő mértékű, de csak indirekt módon adnak információt a májsejtek metabolikus működéséről. A májminták hagyományos szövettani vizsgálata pedig időigényes, és az értékelés erősen függ a vizsgáló személyétől.²

A májsejtek metabolikus aktivitásáról és energia-homeosztázisáról a mitochondrialis funkciók értékelése

közvetlen és objektív információt nyújthat, de az eddigi vizsgálóeljárások nem tették lehetővé e módszerek rutin diagnosztikai alkalmazását. A mitochondrialis belső membránjában található légzési lánc négy komplexből (I., II., III., IV. komplex), egy lipidkomponensből (ubikinon), valamint a hem-csoportot tartalmazó citokróm c fehérjéből áll. A légzési lánc működése során elektronokat továbbít a végső elektronakceptor oxigénmolekula felé, miközben az ionszatórnaként is funkcionáló komplexeken keresztül protonokat pumpál ki a mátrixból az intermembránterbe. A létrejövő protongradienst az ATP-szintáz használja fel működéséhez, amely a belső membrán mátrix felőli oldalán az ADP→ATP átalakulásért felel. Az I–IV. légzési komplexek a belső membránban egymással összekapcsolódva, úgynevezett szuperkomplexek formájában találhatók meg³.

Az oximetria szövetminták oxigénfogyasztásának meghatározására szolgáló eljárás, az oxigráffal a mitochond-

[@]Levelezési cím/Corr. address: Dr. Hartmann Petra, Szegedi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Sebészeti Műtéttani Intézet, 6720 Szeged, Szőkefalvi-Nagy Béla u. 6. Telefon: +36 62 545 743; E-mail: hartmann.petra@med.u-szeged.hu



1. ábra. Oxygraph-2k nagy felbontású respirométer

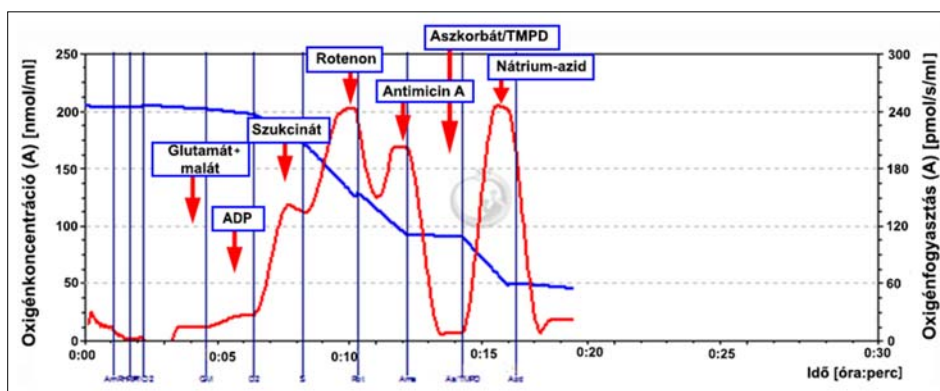
riális elektrontranszportot, az oxidatív foszforilációt és az ATP-szintézis hatékonyságát lehet megítélni.⁴ Az új generációs oxigráfokkal lehetőség nyílik kisméretű (≥ 10 mg) minták, akár finomtű-biopsziát követő vagy műtétek során vett biopsziák fagyasztás nélküli vizsgálatára.⁵ Jelen tanulmányunk célja a standardizált, kísérletes körülmények között végzett, nagy felbontású respirométer segítségével történő mitochondriumvizsgálatok bemutatása volt.

Anyag és módszerek

Kísérleteinket az Állatkísérleti Tudományos Etikai Tanács (ÁTET) jóváhagyásával végeztük (Munkahelyi Állatjóléti Bizottság – MÁB) (engedélyszám: V./148/2013). A mitochondriumok *in vitro* vizsgálatára a humán minták fogadására is alkalmas OROBOROS Oxygraph-2k (Innsbruck, Ausztria) nagy felbontású respirométert és kiegészítő LED2 fluoreszcens modult használtuk (1. ábra). A respirométer a Clark-elektrod (bipoláris elektrokémiai oxigénszenzor) elvén működő mérőrendszer, amely nagy pontossággal képes biológiai minták pillanatnyi oxigénfogyasztásának meghatározására és követésére. Az elektródot polipropilén memb-

rán borítja, ami oxigénre és szén-dioxidra permeábilis, de nem ereszt át a vizet és az ionokat, továbbá megakadályozza olyan vegyületek bejutását az elektródokhoz, amelyek azokat károsíthatják vagy zavarhatják a mérést. A kicsiny katódfelület, a zárt mintatartó és a minta keverése biztosítja, hogy a minta térfogatában az oxigénkoncentráció állandó, amit a katódon történő oxigénfogyasztás nem befolyásol. Ez adja az oxidatív foszforiláció mint alapvető mitochondriumfunkció vizsgálatának az alapját.

A módszer további tulajdonsága, hogy a mitochondrium légzési láncának komplexei működés közben szelektíven vizsgálhatók, miközben valós időben követhetők a változások. A mitochondriális funkciók meghatározása során a terminális oxidációban részt vevő komponenseket szubsztrátok és inhibitorok használatával lehet vizsgálni. A májból vett mintából homogenizátumot készítünk, amelyhez először glutamát (2 mM) és malát (10 mM) -szubsztrátok hozzáadásával aktiváljuk az I. komplexet, majd indukáljuk az oxidatív foszforiláció folyamatát ADP-vel (2,5 mM). Szukcinát (10 mM) hozzáadásával aktiválódik a II. komplex, ezáltal meghatározható az I. és II. komplex maximális aktivitása. Ha rotenonnal (0,5 μ M) gátoljuk az I. komplexet, külön-külön mérhetővé válik az I. és a II. komplex kapaci-



2. ábra. Egy nagy felbontású respirometriás mérés eredeti regisztrátuma

tása. Antimicin A (2,5 μM) hatására a III. komplex gátlódik. Végül elektrondonorokkal (aszkorbát [2 mM]/*N,N,N,N*-tetramethyl-*p*-phenylenediamin [TMPD] [20 μM]) aktiváljuk a IV. komplexet, amit nátrium-aziddal (50 mM) lehet gátolni (2. ábra).

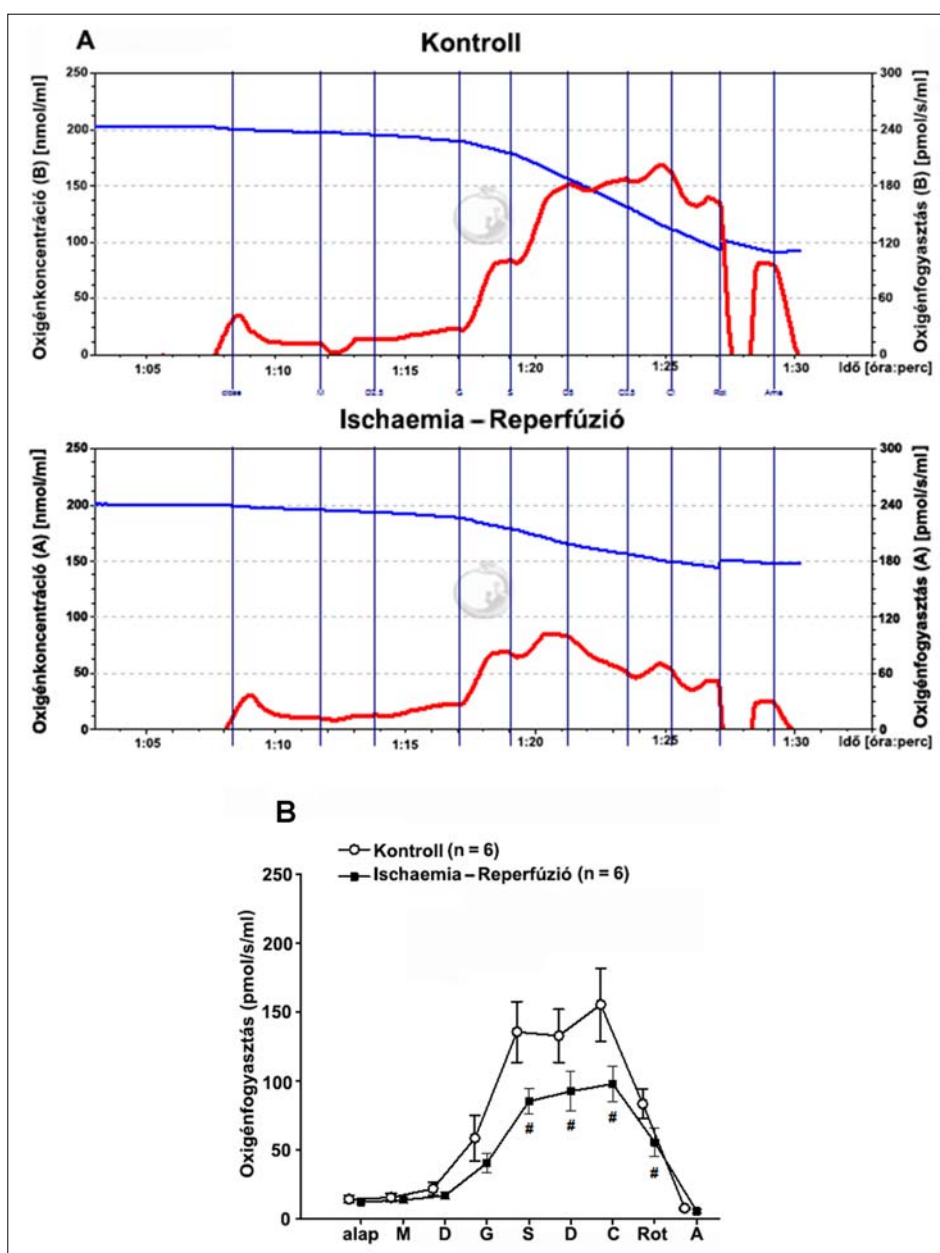
Műtéti beavatkozás

A sebészi beavatkozások során előforduló érkirekesztés következményeinek vizsgálatára részleges máj ischaemia/reperfúziós modellt alkalmaztunk altatott hím *Sprague-Dawley* patkányok (átlagos súly 300 ± 20 g, csoportonként hat-hat) felhasználásával, amelyeket ellenőrzött körülmények között, 12 órás nappal-éjszaka ciklusban, laboratóri-

umi tápon tartottunk.

Az állatokat Na-pentobarbitállal altattuk (45 mg kg^{-1} , intraperitonealisan), majd a jobb oldali vena jugularis externát és az arteria carotis communist kireparáltuk. Az erekbe 22 G méretű polietilén kanült vezetettünk, a vénás kanülon keresztül történt szükség szerint a folyadékpótlás és az anesztézia fenntartása. A szabad légút biztosítására a tracheába tracheostomán keresztül 3 mm-es szilikonkanült helyeztünk.

Medián laparotomia után kétoldali subcostalis metszések történtek, a behatolási kapukból mobilizáltuk a májat, a vena portae hepatis ágait és az arteria hepaticát. Kontrollbiopszia után az arteria hepatica és a vena portae hepatis bal ágainak leszorításával a bal májlebery teljes ischae-



3. ábra. Ép és ischaemia/reperfúzió (IR) átesett májmitochondriumok oxigénfogyasztása. A) Eredeti regisztrátumok. B) Szubsztrát-szétkapcsolószer (SUIT) protokoll bemutatása. alap = alapvonal; M = malát; D = ADP; G = glutamát; S = szukcinát; C = karbonil cianid 3-klorofenilhidrazon (CCCP) szétkapcsolószer; Rot = rotenon; A = antimicin A

miáját hoztuk létre. Az egyórás időtartam után az ereket felengedtük, és a bal lebenyből a reperfúzió 60. percében szövetmintákat vettünk, amelyeket üveghomogenizálóval jégen homogenizáltunk. Ezt követően a májmintákat a respirométer kamrába helyeztük. Az oxigénfogyasztás intenzitásának mérése az egyes légzési komplexek számára hasznosítható szubsztrát-szétkapcsolószer-gátlószer protokollok szerint történt. A mérési eredményeket párhuzamosan álműtött, kontrollállatok májmintáinak értékeivel vetettük össze.

Statisztikai analízis

Az adatokat a SigmaPlot 12.5 statisztikai szoftver (Jandel Corporation, San Rafael, CA, Amerikai Egyesült Államok) segítségével értékeltük ki. A csoportok közötti különbségek kimutatásához kétutas ANOVA-t, majd ezt követően Bonferroni post hoc tesztet használtunk. Munkánk során az adatokat az átlag és átlag szórásaként (mean \pm SEM) tüntettük fel. A változásokat $p < 0,05$ szint esetén tekintettük szignifikánsnak.

Eredmények

A 3. ábra eredeti regisztrátuma egy ischaemia/reperfúzió során károsodott és egy áloperált állatból származó májminta mitochondriumainak respirációs aktivitását ábrázolja. A különbség jól látható, az ischaemia/reperfúzió hatására jelentősen csökkent a légzési lánc kapacitása, vagyis az elektrontranszport hatékonysága, valamint szignifikánsan alacsonyabb oxidatív foszforilációs kapacitás ($120,7 \pm 6,2$ pmol/ml/s vs. $80,6 \pm 2,8$ pmol/ml/s) észlelhető. A mitochondriumok kapcsoltsága romlott ($140,9 \pm 3,09$ pmol/ml/s vs. $90,2 \pm 3,09$ pmol/ml/s), ami megnövekedett reaktív oxigén-szabadgyök termelődésére és a membrán károsodására utal. A légzési komplexek szelektív vizsgálatával az ischaemia/reperfúzió alatt kialakuló elektrontranszportlánc zavara mögötti oki tényezőként az I. komplex kiemelt szerepe igazolódott ($70,77 \pm 2,39$ pmol/ml/s vs. $40,9 \pm 2,05$ pmol/ml/s).

Megbeszélés

A máj mitochondriális funkciózavara kórjelző lehet számos esetben, például steatosis, cirrhosis, hepatocellularis carcinoma és cholangiocarcinoma esetén.^{6–8} A mitochondriális légzési lánc zavarának kimutatására, vizsgálatára szolgáló módszer a közelmúltban kifejlesztett nagy felbontású respirometria, amelyet jelenleg még főleg kísérletes körülmények között használnak. Respirometriával kapott eredményeink megerősítik más kutatócsoportok eredményeit, miszerint a máj ischaemia/reperfúziós károsodása a mitochondriális elektrontranszportlánc hatékonyságának és az I. komplex respirációs aktivitásának csökkenésével jellemezhető.^{8–11}

A respirométer két csatornája párhuzamos méréseket tesz lehetővé, ami egyrészt a vizsgálat pontosságát növeli, valamint kísérletek során lehetővé teszi különböző kezelési csoportok azonnali összehasonlítását. Klinikai körülmények között kisméretű, homogenizált májmintákat lehet diagnosztikus célra használni, de a rendszer más mitochondriumpreparátumok mérésére is alkalmas: izolált mitochondriumok, szöveti homogenizátum, sejtszuspenzió, izomrostok, illetve speciálisan metszett szövetdarabok is vizsgálhatók.¹² A készülékkel, az oxigénfogyasztás mérésével párhuzamosan, ugyanazon mintából a teljes szabadgyök-produkció, mitochondrialis membránpotenciál, valamint a Ca^{2+} -szint meghatározását is el lehet végezni.

A fentieket összefoglalva elmondhatjuk, hogy a respirometria alkalmasnak bizonyult az ischaemia/reperfúzióval járó mitochondriális károsodás kimutatására és a légzési lánc aktivitásának mérésére. Saját kísérletes vizsgálataink és más kutatócsoportok eredményei is arra utalnak, hogy a respirometriás technika alkalmazásával lehetőség nyílt a mitochondriális diszfunkcióval járó humán májbetegségek klinikai diagnosztikájára, valamint egyes terápiás beavatkozások hatékonyságának növelésére is.^{11,13}

Kutatási támogatás: OTKA K104656

Irodalomjegyzék

- ¹ Clavien PA, Oberkofler CE, Raptis DA, Lehmann K, Rickenbacher A, El-Badry AM: What is critical for liver surgery and partial liver transplantation: size or quality? *Hepatology* 2010; 52: 715–729
- ² Tevar AD, Clarke C, Wang J, Rudich SM, Woodle ES, Lentsch AB, Edwards ML: Clinical review of nonalcoholic steatohepatitis in liver surgery and transplantation. *J Am Coll Surg* 2010; 210: 515–526
- ³ Vartak R, Porras CA, Bai Y: Respiratory supercomplexes: structure, function and assembly. *Protein Cell* 2013; 4: 582–590
- ⁴ Hall A, Larsen AK, Parhamifar L, Meyle KD, Wu LP, Moghimi SM: High resolution respirometry analysis of polyethylenimine-mediated mitochondrial energy crisis and cellular stress: Mitochondrial proton leak and inhibition of the electron transport system. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1827: 1213–1225
- ⁵ Pesta D, Gnaiger E: High-resolution respirometry: OXPHOS protocols for human cells and permeabilized fibers from small biopsies of human muscle. *Methods Mol Biol* 2012; 810: 25–58
- ⁶ Jelenik T, Roden M: Mitochondrial plasticity in obesity and diabetes mellitus. *Antioxid Redox Signal* 2013; 19: 258–268
- ⁷ Domenis R, Comelli M, Bisetto E, Mavelli I: Mitochondrial bioenergetic profile and responses to metabolic inhibition in human hepatocarcinoma cell lines with distinct differentiation characteristics. *J Bioenerg Biomembr* 2011; 43: 493–505

- ⁸ *Gnaiger E, Kuznetsov AV, Schneeberger S, Seiler R, Brandacher G, Steurer W, Margreiter R*: Mitochondria in the cold. In: *Life in the cold*. New York: Springer; 2000. p. 431–442
- ⁹ *Chu MJ, Hickey AJ, Jiang Y, Petzer A, Bartlett AS, Phillips AR*: Mitochondrial dysfunction in steatotic rat livers occurs because a defect in complex i makes the liver susceptible to prolonged cold ischemia. *Liver Transpl* 2015; 21: 396–407
- ¹⁰ *Chu MJ, Hickey AJ, Tagaloa S, Zhang L, Dare AJ, MacDonald JR, Yeong ML, Bartlett AS, Phillips AR*: Ob/ob mouse livers show decreased oxidative phosphorylation efficiencies and anaerobic capacities after cold ischemia. *PLoS One* 2014; 9(6): e100609
- ¹¹ *Strifler G, Tuboly E, Szél E, Kaszonyi E, Cao C, Kaszaki J, Mészáros A, Boros M, Hartmann P*: Inhaled methane limits the mitochondrial electron transport chain dysfunction during experimental liver ischemia-reperfusion injury. *PLoS One* 2016; 11: e0146363
- ¹² *Kuznetsov AV, Strobl D, Ruttmann E, Königsrainer A, Margreiter R, Gnaiger E*: Evaluation of mitochondrial respiratory function in small biopsies of liver. *Anal Biochem* 2002; 2: 186–194
- ¹³ *De Andrade DC, de Carvalho SN, Pinheiro D, Thole AA, Moura AS, de Carvalho L, Cortez EA*: Bone marrow mononuclear cell transplantation improves mitochondrial bioenergetics in the liver of cholestatic rats. *Exp Cell Res* 2015; 336: 15–22