

Transzmetilezési folyamatok és a redox-homeosztázis

Kleiner Dénes dr.¹ ■ Bersényi András dr.² ■ Fébel Hedvig dr.³
Hegedűs Viktor dr.¹ ■ Mátyás Eszter^{1*} ■ Sárdi Éva dr.⁴

¹Semmelweis Egyetem, Gyógyszerésztudományi Kar, Farmakognózi Intézet, Budapest

²Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar,

Állattenyésztési, Takarmányozástani és Laborállat-tudományi Intézet, Budapest

³Állattenyésztési és Takarmányozási Kutatóintézet, Herceghalom

⁴Budapesti Corvinus Egyetem, Kertészettudományi Kar, Genetika és Növénynevelés Tanszék, Budapest

Bevezetés: A transzmetilezés térszerkezet-módosító szubsztitúciós folyamat. Feladata az élő szervezetekben, többek között, a fehérje- és génműködés szabályozása. A táplálékláncon keresztül szervezetbe juttatott metildonor vegyületek hasznosulása, illetve a könnyen mobilizálható metilpool analitikai módszerekkel nyomon követhető. *Célkitűzés:* A szerzők célul tűzték ki néhány növényi (búza, bab, cékla, káposzta) és állati (baromfi- és nyúlmáj) eredetű táplálék könnyen mobilizálható metilcsoportjainak koncentrációmérését, a transzmetilezés és a redox-homeosztázis kapcsolatának vizsgálatát baromfi- és nyúlmájban, valamint e paraméterek tanulmányozását kísérletes zsírmájban, patkányban. *Módszer:* Patkánykísérletben a tápot koleszterin, napraforgóolaj és kólsav eltérő koncentrációival dúsították. A könnyen mobilizálható metilcsoportok meghatározása túlnyomós rétegekromatográfiás módszerrel, a hidrogéndonor-aktivitás mérése 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil stabil szabad gyök alkalmazásával, spektrofotometrián történt. *Eredmények:* A vizsgált növényi minták közül a legjelentősebb metilpoolal a babmagok rendelkeztek. A baromfimáj a nyúlmájnál szignifikánsan nagyobb könnyen mobilizálható metilcsoportszintet és hidrogéndonor-aktivitást mutatott. Patkányokban, súlyos zsírmájban csökkent a hidrogéndonor-aktivitás, és szignifikánsan csökkent a könnyen mobilizálható metilcsoportszint. *Következtetések:* Az eredmények felhívják a figyelmet a táplálkozás jelentőségére, különösen az elhízással összefüggő megbetegedések kapcsán. Orv. Hetil., 2013, 154, 1180–1187.

Kulcsszavak: transzmetilezés, redox-homeosztázis, zsírmáj, táplálkozási faktor

Transmethylation and the redox homeostasis

Introduction: Transmethylation modifies configuration and proceeds via formaldehyde. It has a significant role for example in epigenetic regulation. The whole methyl-pool can be evaluated by the measurement of bound formaldehyde. *Aim:* The bound formaldehyde was measured in wheat, bean, beetroot, cabbage, broiler- and rabbit liver. The relationship between transmethylation and redox homeostasis was studied in the liver of domestic animals, and in the rat model of fatty liver. *Method:* The diet of rats was enriched with cholesterol, sunflower oil and cholic acid. The bound formaldehyde was determined by overpressured layer chromatography. The hydrogen-donating ability was measured with 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl free radical using spectrophotometric measurement. *Results:* Beans had the most bound formaldehyde. The liver of broilers possessed significantly elevated hydrogen-donating ability and transmethylation ability. Rats with severe fatty liver had significantly less bound formaldehyde and the hydrogen-donating ability tendentially decreased. *Conclusions:* These results draw attention to the diet, especially in obesity and obesity-related diseases. Orv. Hetil., 2013, 154, 1180–1187.

Keywords: transmethylation, redox-homeostasis, fatty liver, alimentary factor

(Beérkezett: 2013. április 6.; elfogadva: 2013. május 29.)

A „Dr. Fehér János Emlékére Alapítvány”-pályázat díjával kitüntetett dolgozat.

*gyógyszerészhallgató

Rövidítések

dimedon = 5,5-dimetilciklohexán-1,3-dion; DPPH = 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil; GSH = glutation; HCHO = formaldehid; KMMCs = könnyen mobilizálható metilcsoport; NADP = nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát; NADPH = redukált nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát; OPLC = nagy nyomású vékonyréteg-kromatográfia; SAH = S-adenozil-homocisztein; SAM = S-adenozil-metionin; THF = tetrahidrofolát

A transzmetilezési folyamatok szervezetünk térszerkezet-módosító szubsztitúciós reakcióinak egyike. A múlt század második felében kezdtek ismertté válni, de még napjainkban is számos tisztázatlan kérdés maradt azzal kapcsolatban, hogy milyen élettani folyamatokban mekkora jelentőséggel bírnak. Szerepüket alátámasztották a génfunkció módosításában, a proliferációban és az apoptózisban is. *Cantoni* már 1951-ben leírta a transzmetilezés sarkalatos pontjait, illetve definiálni tudta, hogy a fő kofaktor valószínűleg az aktivált metionin [1].

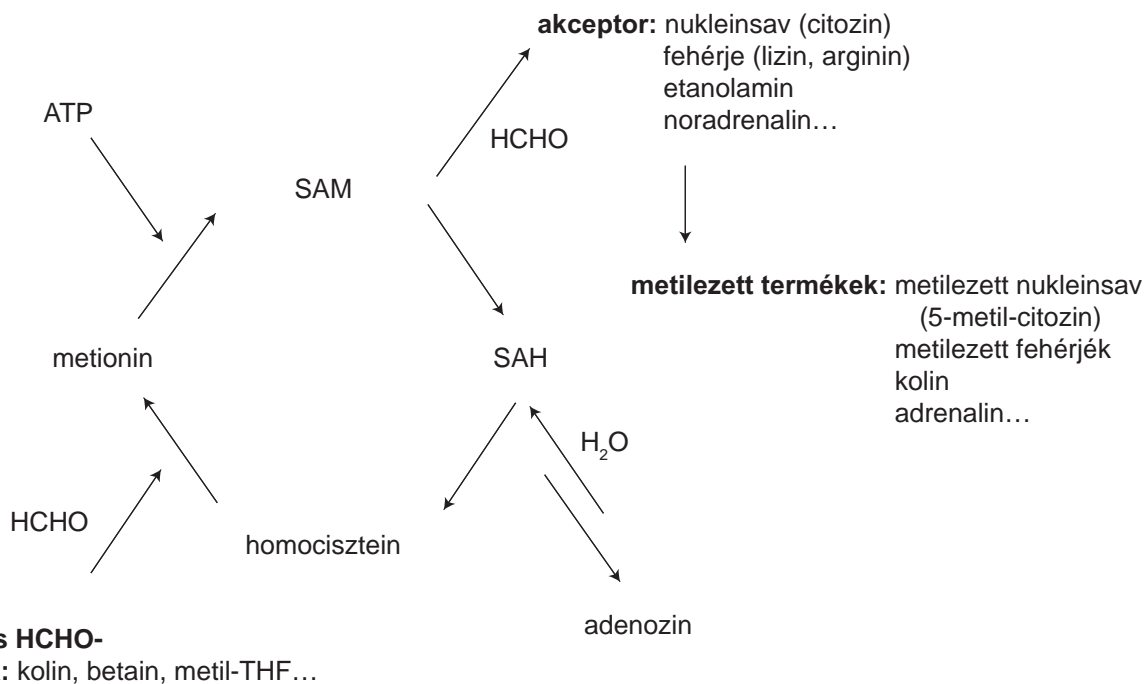
A transzmetilezési folyamatok közül legjelentősebbnek a kreatin-, a foszfatidilkolin- és a szarkozinszintézist tartják. *Stead és munkatársai* ezek mellett kiemelik a homocisztein remetilálását is. A kutatások a fenti folyamatokhoz képest elenyészőnek tüntetik fel a poszt-transzlációs és epigenetikai módosításra felhasznált metildonor-mennyiséget, és kevésbé ismert ezeknek a folyamatoknak az érzékenysége a metildonorkészletre. A publikált eredmények alapján figyelemre méltó a metilezési reakciók hibájával járó rákos megbetegedések száma [2, 3, 4].

A metilpool feltöltöttségének vizsgálata ezért sarkalatos ponttá válhat a rákkutatásban, ezzel párhuzamosan előtérbe kerülhet a metildonor vegyületek használata mind a prevencióban, mind az adjuváns kezelések esetén, többek között az uralhatatlan tumoros anémia során [4].

Ma már bizonyított, hogy a szervezetben zajló metilezési reakciók leggyakrabban S-adenozil-metionin (SAM) kofaktor segítségével, formaldehid (HCHO) átmeneti termék képzésén keresztül történnek [5].

A transzmetilezési folyamatok létfontosságúak mind a növényi, mind az állati sejtek életfolyamataihoz. Szinte az összes fogyasztott élelmiszer tartalmaz kolint, közülük kiemelkedően nagy mennyiség található a tojásban, illetve a májban. Hasonló jelentőségű metildonor vegyület a betain, amelyhez legnagyobb mennyiségben bizonyos csíráztatott magvak vagy például cékla, spenót fogyasztásával juthatunk [6]. Ismert, hogy a növényekben a mobilizálható metilcsoportok mérhető mennyisége általában megemelkedik gomba-, baktérium- vagy vírusfertőzésre, hő- és más abiotikus sokkra [7]. Összehasonlító vizsgálatok igazolták, hogy adott fajon belül a nagyobb ellenállósági szinteket képviselő fajtákban jellemzően nagyobb mennyiségben fordulnak elő a kvaterner ammóniumvegyületek (metildonor vegyületek), mint a fogékonyabbakban. A fotoszintézis folyamán is megfigyelhető HCHO-képződés [8, 9, 10].

Az állati sejtekben lejátszódó transzmetilezési folyamatok jelentőségére többek között *Szende és munkatársainak* megfigyelései hívták fel a figyelmet. Kutatásuk eredményeként metilezett lizinszármazékot mutattak



1. ábra

A transzmetilezés folyamata. A metioninból ATP-vel SAM keletkezik, majd egy metilcsoport leadásával SAH-há alakul. A SAH hidrolíziséből homocisztein keletkezik, amelyet a HCHO előanyagainak tekinthető metildonor vegyületek metilezni tudnak. (Rövidítések: ATP = adenozin-trifoszfát, HCHO = formaldehid, SAH = S-adenozil-homocisztein, SAM = S-adenozil-metionin) (Tíyhák [15] nyomán)

ki Ehrlich-karcinóma-sejtekben, majd tumornövekedést serkentő hatásukat bizonyítani is tudták egereken végzett kísérletben [11]. *Tyibák és munkatársai* 1977-ben azt tapasztalták, hogy míg az N^ε-trimetil-lizin vegyületek a proliferációt fokozták, addig az arginin guanidinocsoportjának metileződése gátolta a sejtosztódást [12].

Huszi és Tyibák 1986-ban bizonyították, hogy az endogén metilezési és demetilezési folyamatok egyaránt HCHO-t generálnak. Az átmeneti termékként keletkező HCHO 5,5-dimetilciklohexán-1,3-dionnal (dime-don) mint adduktképző vegyülettel formaldemetonként megköthető és analitikai módszerekkel mennyiségileg mérhető (*1. ábra*) [5, 13, 14].

A transzmetilezési reakciókban az akceptor molekulák metilezése a SAM metilcsoportjából képződő endogén HCHO-n keresztül valósul meg [15]. Az aminosavak, fehérjék, RNS vagy DNS metileződése enzimatikusan, HCHO-n keresztül történik, miközben S-adenozil-homocisztein (SAH) keletkezik. A SAH SAH-hidroláz hatására adenzinra és homociszteinre bomlik. A homociszteint a homocisztein-metiltranszferáz metilálja, vagy a cisztationin-szintetáz és a cisztationin-liáz segítségével α -ketobutiráttá alakul. A homocisztein-metiltranszferáz kofaktora a kobaltkationot tartalmazó korrinvázis B₁₂-vitamin. Az endogén metilezés során metionin keletkezik, amely metionin-adenozil-transzferáz segítségével SAM-má alakul. Ezt a körfolyamatot aktivált metilciklusnak hívják. Ha cisztationinon keresztül történik a homocisztein lebomlása, a szulfhidrilcsoport egy szerin hidroxilcsoportját szubsztituálja, és cisztein keletkezik. Ennek az átalakulásnak szignifikáns szerepe lehet a sejtek redox-homeosztázisa szempontjából is. A cardiovascularis események rizikófaktoraként ismert homocisztein annak ellenére, hogy szabad szulfhidrilcsoportot tartalmaz, oxidatív stresszt okoz. Ennek hátterében valószínűleg a *Hogg* által leírt autooxidációs mechanizmus állhat [16, 17, 18, 19].

Az élő szervezetek dinamikus egyensúlyt, homeosztázist/redox-homeosztázist tartanak fenn. Az életfunkciókhoz nemcsak az antioxidáns védelem, hanem a mérsékelt oxidatív stressz is nélkülözhetetlen. A szabad gyökök szerepet játszanak a jelátviteli folyamatokban, a sejtosztódásban és a programozott sejthalálban [16, 20]. Feltételezhetően a transzmetilezés és a redox-homeosztázis szoros kapcsolatban vannak egymással. A glutationrendszer (GSH-rendszer) működéskéhez szükséges GSH-ban egy ciszteinmolekula található. A cisztein kénatomja a SAM keletkezéséhez szükséges metionintól származik [1, 15, 21]. A metionin szintéziséhez folsav szükséges, amelyet a dihidrofolát-reduktáz NADPH segítségével tetrahidrofoláttá (THF) redukál. Kolin, betain és egyéb metildonor vegyületek jelenlétében a THF képes metil-THF-fé alakulni és transzmetilezési folyamatokat katalizálni [21].

Attika tartományban (Görögország), 2002-ben, egészséges felnőtteken végzett tanulmány alapján a nők

napi kolin-fogyasztása átlagosan 285 mg, a férfiaké 291 mg volt. A napi betain-fogyasztást nők esetében 314 mg-nak, férfiak esetében 306 mg-nak találták. A gyulladási faktorok szintje 310 mg feletti kolin-fogyasztásnál szignifikánsan, a homocisztein mennyisége csak tendenciózusan csökkent. Ha a napi betain-fogyasztás meghaladta a 350 mg feletti értéket, a homocisztein és a tumornekrózisfaktor- α szintje szignifikánsan, az interleukin-6 és a C-reaktív protein szintje csak kismértékben csökkent [22].

Bizonyított, hogy az élő szervezetekben lejátszódó metilezési, demetilezési reakciók átmeneti termékként egyaránt HCHO-t generálnak [5, 15]. A dime-donnal megköthető és analitikai módszerekkel meghatározható HCHO-mennyiség mérésével a szervezetben lejátszódó transzmetilezési folyamatokról, a könnyen mobilizálható metilpool nagyságáról és annak különböző hatásokra bekövetkező változásairól, zavarairól kaphatunk képet.

A tumorok kialakulása, a genetikai determináltság mellett, megközelítőleg 30%-ban függ a táplálkozás minőségétől [23, 24]. A táplálkozási faktorok vizsgálata primer és szekunder prevencióban azonban hiányos, ezért arra voltunk kíváncsiak, vajon az élő szervezetek transzmetilezési folyamatainak – különböző megközelítési utakkal – eddig feltárt jelentősége a táplálkozási lánc különböző szintjein miképpen valósul meg. Munkánk során ezért meghatároztuk egyes növényi (búza, bab, cékla, káposzta) és állati (baromfi-, illetve nyúlmáj) eredetű minták könnyen mobilizálható metilcsoportjainak (KMMCs) mennyiségét. A kontrolltápon tartott állatokban a hidrogéndonor-aktivitást mérve vizsgáltuk a kapcsolatot a metilpool és az antioxidánskapacitás között. Abból a megfontolásból, hogy az elhízás napjaink civilizációs betegsége, patkánykísérletben arra voltunk kíváncsiak, hogy a máj elzsírosodási folyamatában milyen mértékben változik a metilpool.

Anyagok és módszerek

Anyagok

Vizsgálatainkhoz a bovine szérumalbumint, a Folin-Ciocalteu-fenolreagenst, az 5,5-dimetilciklohexán-1,3-diont és az 1,1-difenil-2-pikrilhidrazilt a Sigma-Aldrich Kft.-től (St. Louis; Amerika Egyesült Államok), a szilikagél 60 F₂₅₄ vékonyrétegeket a Merck Kft.-től (Darmstadt, Németország), a többi reagenst a Reanal-KER Kft.-től (Budapest, Magyarország) szereztük be. A liofilizált céklapor a GPS Powder (Budapest, Magyarország) ajándéka.

Állatkísérletek

Az állatkísérleteket a 40/2013. (II. 14.) kormányrendeletnek az állatkísérletekről (az állatok védelméről és kíméletéről) szóló 1998. évi XXVIII. törvény módosí-

tása alapján végeztük. A patkánykísérlet engedélyszáma: 770/004/04; a brojlerkísérlet engedélyszáma: 22.1/613/001/2010; míg a nyúl kísérlet engedélyszáma: 22.1/5/003/2010.

Patkánykísérlet

Vizsgálatainkhoz összesen tizenöt hím Wistar patkányt (200–250 g) használtunk (Biofarm Prompt Kft., Gödöllő, Magyarország). A kísérlethez a zsírmáj hisztológiailag is igazolt modelljét alkalmaztuk [20]. A kontrollcsoport ($N = 5$) csak standard patkánytápot fogyasztott. A zsírdús diétán tartott állatok egyik csoportja ($N = 5$) 2% koleszterint, 20% étolajat és 0,5% kólsavat kapott a kontrolltápotba keverve, a másik ($N = 5$) pedig 1% koleszterinnel, 0,3% kólsavval és 11% napraforgóolajjal dúsított tápot kapott. A 10. napot követően mélyaltatásban (ketamin 75 mg/ttkg, xilazin 7,5 mg/ttkg) a hasi vénán keresztül elvéreztettük az állatokat. Májukat a kivéreztetés után izotóniás NaCl-oldattal mostuk és homogenizáltuk, majd a további vizsgálatokig $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk.

Baromfi- és nyúl kísérlet

Hat brojlercsirkét (Babadi Baromfikeltető Kft., Ócsa, Magyarország) és hat nyulat (Lab-Nyúl Kft., Gödöllő, Magyarország) állítottunk kísérletbe. Az állatok kereskedelmi baromfi-, illetve nyúltápot ettek. A baromfikat 42 napos korban, a baknyulakat pedig négy hónapos korukban termináltuk. A májából homogenizátumot készítettünk. A vizsgálatokig a mintákat $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk.

Fehérjemeghatározás

A májhomogenizátumok fehérjekoncentrációját *Lowry és munkatársai* által kidolgozott eljárással határoztuk meg. A májhomogenizátumokat szérumalbuminra nézve 10 mg/ml-esre állítottuk be [25].

A KMMCs mennyiségének meghatározása

Kereskedelmi forgalomban kapható búza- (*Triticum aestivum* L.) és babmagok (*Phaseolus vulgaris* L.), valamint zöldségnövények (cékla: *Beta vulgaris* L. var. *rubra*, káposzta: *Brassica oleracea* L.) homogenizált mintáihoz meghatározott mennyiségi arányokban dimedont adtunk, majd ultrahangos kezelést követően, két napos reakcióidő után, 5 percig centrifugáltuk 2000 rpm-mel $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on. A felülúszó 25 μl -ét szilikagél 60 F₂₅₄ vékonyrétegre vittük fel, és kloroform–diklórometán (35:65) eluenssel nagynyomású vékonyréteg-kromatográfiás eljárással (OPLC-NIT Kft., Budapest, Hungary) szeparáltuk.

A nyúl-, baromfi- és patkánymájak esetében azonos módon jártunk el, de a dimedont, mint adduktképzőt, bovin szérumalbuminra nézve 10 mg/ml koncentrációra hígított homogenizátumhoz adtuk.

Az elválasztást követően valamennyi vizsgált mintánál Shimadzu CS-930 denzitométerrel határoztuk meg a KMMCs és dimedon reakciójából keletkező formaldehton mennyiségét ($\lambda = 270\text{ nm}$) [26].

Hidrogéndonor-aktivitás mérése

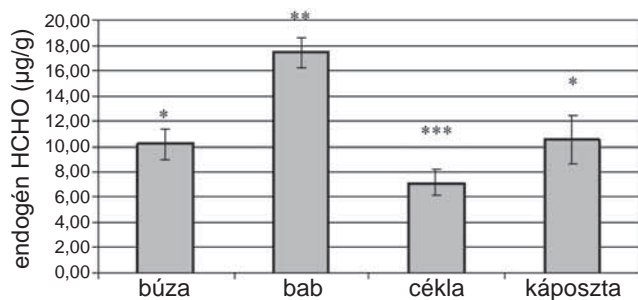
A vizsgálat során 50 μl standardizált májmintát 1 ml-re egészítettünk ki bidesztillált vízzel, és 1 ml metanolt adtunk hozzá. 0,5 ml 9%-os 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) stabil gyök oldatát mértük az elegyhez, és 30 percig $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on temperáltuk. 3000 rpm-en ülepítettük, majd felülúszó abszorbanciáját metanollal készült vakoldal mellett határoztuk meg Specord UV VIS spektrofotométerrel ($\lambda = 517\text{ nm}$). Az eredményt a gátlásszázalékban határoztuk meg [27].

Statisztikai értékelés

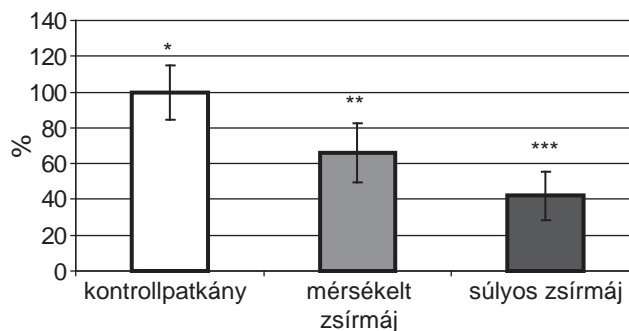
Eredményeink értékeléséhez Statistica 11 (StatSoft Inc., Tulsa, Amerikai Egyesült Államok) programot és Microsoft Office Excel 2003 (Microsoft Corp., Redmond, Amerikai Egyesült Államok) programot használtunk. Shapiro–Wilks-teszt alapján döntöttünk a változók normalitásáról. Eltérő fajok májmintái esetében, ahol a normalitás feltétele nem teljesült, a Mann–Whitney-féle U-tesztet használtuk a két minta összehasonlítására. Fajon belül, a nyúl- és baromfimájak esetén tapasztalt normális eloszlás miatt, Pearson-féle korrelációs koefficiens (r) számítását végeztük el. A növényi minták és a patkánykísérletben tapasztalt normális eloszlás következményeként a különbség kimutására egy szempontos ANOVA-módszert használtunk. Post-hoc tesztként a Fischer-féle LSD-próbát (legkisebb szignifikáns különbség) alkalmaztuk. Minden esetben a $p \leq 0,05$ valószínűségi értékeket tekintettük szignifikánsnak.

Eredmények

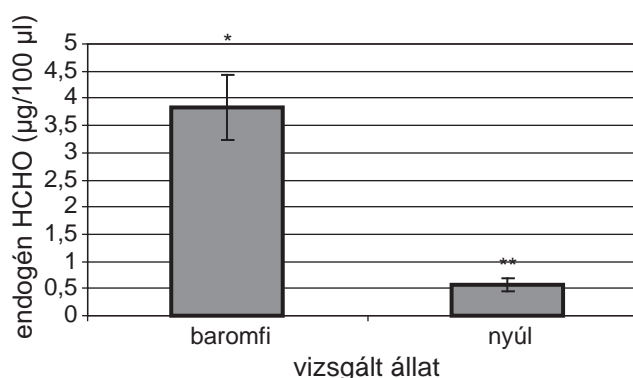
A növényi eredetű minták közül megvizsgáltuk a búza- (b) és a bab- (B) magok, illetve a céklarépatest (c) és a káposztalevél (k) egységnyi nedves tömegre vonatkoztatott KMMCs-tartalmát. Az ANOVA szignifikáns eltérést mutatott ($p = 0,0001$), ezért vizsgáltuk a fajok közötti különbségeket is. Csak a káposzta és a búza között nem találtunk szignifikáns eltérést ($p_{b/k} = 0,7760$; $p_{k/B} = 0,0003$; $p_{c/b} = 0,0271$). A 2. ábrán látszik, hogy a legjelentősebb mennyiséget, átlagosan 17,45 $\mu\text{g/g}$ -ot a bab tartalmazta, míg a céklában megközelítőleg 2,5-szer kevesebbet tudtunk kimutatni nedves tömegre vonatkoztatva.



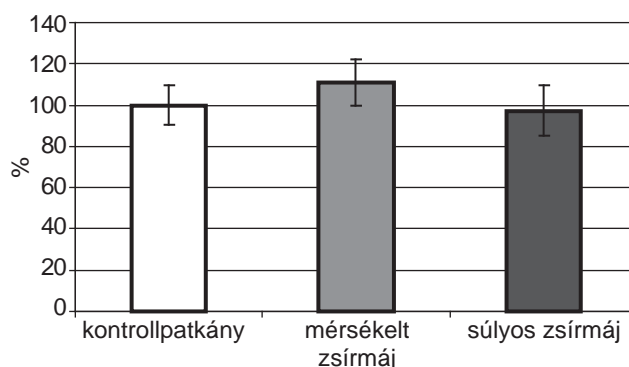
2. ábra | Különböző élelmiszernövények nedves tömegre vonatkoztatott könnyen mobilizálható metilcsoportjainak koncentrációja (*vs.**; **vs.***; *vs.***; $p \leq 0,05$)



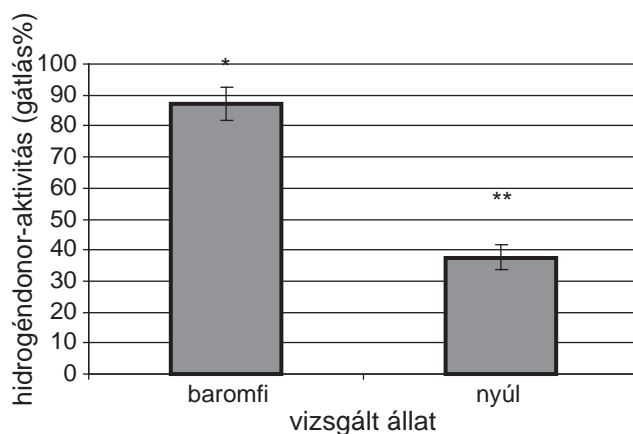
5. ábra | Könnyen mobilizálható metilcsoportok koncentrációjának aránya a patkánykísérletben (*vs.**; **vs.***; *vs.***; $p \leq 0,05$)



3. ábra | Könnyen mobilizálható metilcsoportok koncentrációja baromfi- és nyúlmájban (*vs.**; $p \leq 0,05$)



6. ábra | Hidrogéndonor-aktivitás a patkánykísérletben (szignifikancia: nem domináns)



4. ábra | Hidrogéndonor-aktivitás baromfi- és nyúlmájban (*vs.**; $p \leq 0,05$)

A baromfi- és a nyúlmájban mérhető KMMC-s mennyiségét a 3. ábrán tüntettük fel. Az azonos fehérjekoncentrációra számított KMMC-s-mennyiség baromfimájban a Mann–Whitney-féle U-teszt alapján szignifikánsan több volt ($p = 0,0051$), közel hétszer annyi, mint a nyúlmájban.

A májmintákban mért hidrogéndonor-aktivitás (4. ábra) a Mann–Whitney-féle U-teszt alapján szintén szignifikánsan eltért ($p = 0,0051$). Emellett az ábrákról leolvasható, hogy magasabb antioxidánszint mellett a

KMMC-s mennyisége szintén magasabb volt. Fajokon belül vizsgálva a korrelációt, a hidrogéndonor-aktivitás a dimedonnal megköthető metilcsoportok mennyiségével jól korrelált baromfimájban ($r^2 = 0,8963$; $p = 0,0027$), ezt nyúlmájban jelenleg nem tudtuk igazolni ($p = 0,5309$).

Patkánykísérletben mérsékelt és súlyos alimentáris eredetű zsírmájban vizsgáltuk a hidrogéndonor-aktivitást és a KMMC-s mennyiségét (5. és 6. ábra). A hidrogéndonor-aktivitás csak tendenciózusan változott ($p = 0,1658$). Mérsékelt zsírmáj esetén enyhe emelkedést figyeltünk meg a kontrollértékekhez (k) viszonyítva, míg súlyos zsírmájban kismértékű, statisztikailag nem szignifikáns csökkenést tapasztaltunk. A KMMC-s mennyisége mindkét típusú zsírmájban szignifikánsan csökkent ($p_{\text{HCHO}} = 0,0002$). A post hoc vizsgálat során bizonyítottuk, hogy mind az enyhén zsírdús (e), mind a zsírdús táp (S) hatására szignifikánsan kevesebb KMMC-s volt mérhető ($p_{k/c} = 0,0040$; $p_{c/s} = 0,0287$).

Megbeszélés

A transzmetilezési folyamatok zavara szerteágazó következményekkel járhat, mint például a karcinogenezis vagy az anémia kialakulása. Ezek hátterében például az epigenetikai szabályozás metilezési reakcióinak hibája állhat. Az epigenetikai modifikációk nem a DNS szek-

venciáját érintik, hanem a DNS-láncon vagy a hisztonmolekulákon történnek [28].

Jellemző, hogy a DNS citozin nukleotidjai metileződnek, így 5-metilcitozin keletkezik, vagy a hisztonfehérjék meghatározott lizin vagy arginin aminosavai módosulnak [29, 30]. A hisztonmodifikáció a G2 fázisban a legintenzívebb, aminek hiányában az osztódás alatt a heterokromatin szerkezete nem megfelelő, illetve a mitotikus orsók és a kromoszómák kapcsolódása is sérül [31].

Általában az erősebb DNS-metiláltság kisebb transzkripciósi aktivitással, a gyengébb metilezettség nagyobb transzkripciósi aktivitással jár. Ennek köszönhető, hogy a génfunkciónak megfelelően hipo- és hipermetilezettség is malignitáshoz vezethet [4].

Christman és munkatársai már 1980-ban alacsonyabb 5-metilcitozin-szintet írtak le erythroleukaemia-sejtekben, de a hipometilezettség szerepét *Gama-Sosa és munkatársai* metasztázisos daganatban, illetve benignus tumorban szenvedő betegek és egészséges emberek szövetmintáinak vizsgálatával támasztották alá. A metasztázist adó daganatokban szignifikánsan alacsonyabb volt a DNS metilezettségének szintje [32]. *Diala és munkatársai* emellett sejtvonalak megfigyelésével bizonyították a hipometilezettség szerepét malignitásokban [32, 33, 34]. *De Bustros és munkatársai* azonban felhívják a figyelmet a tumorsuppresszor gének környékén megfigyelhető hipermetiláltságra is. Hasonlórt írtak le *Makos és munkatársai* agytumorsejtek DNS-ének bizonyos szakaszain [35, 36].

Jelen ismereteink szerint egy-egy tumoros elváltozás a DNS bizonyos szakaszainak hipermetilezettségével és kiterjedt hipometilezettséggel jellemezhető [37, 38].

A metilpool telítettsége is okozhatja az endogén transzmetilezés diszfunkcióját. A könnyen mobilizálható metilcsoportok (KMMCs) mennyiségének szintén nagy jelentősége van a sejtműködésben [39].

A csontvelőben történő vérképzés az egyik legintenzívebb sejtosztódással járó folyamat. A proliferáció különböző fázisaiban más és más a szerepe a transzmetilezésnek, gátoltsága pedig zavart okozhat például a mitózisban, de a hemoglobin képződésében is [40]. A hemoglobin szintéziséhez metilezni kell a proteint, amit a csökkent metildonor-kapacitás nem tesz lehetővé [41]. Emberben a metildonorraktárak kiürülése a vörösvértestek KMMCs-szintjének meghatározásával követhető. A vörösvértestek mobilizálható metilcsoporthiánya daganatos betegekben diagnosztikus értékű [42].

Colectomiát elszenvedett vastagbél-daganatos betegek és egészséges kontrollok vizsgálata kapcsán leírták, hogy a betegek erythrocytaiban a daganat sebészi eltávolítását követően is szignifikánsan kevesebb volt a metildonorraktárak, mint az egészségesekben. Ha metasztázist is adott a tumor, újabb szignifikáns csökkenést tapasztaltak. A redoxparaméterek jelentősebb változását a nem metasztázisban szenvedő betegekben figyelték

meg. Áttét esetén szignifikánsan megemelkedett a protoporfirin IX mennyisége, ami az elégtelen transzmetilezés eredménye. Nagy koncentrációban a jelen lévő protoporfirin IX antioxidánsként viselkedett. A transzmetilezési kapacitásban megfigyelhető differenciák a tumormarkerek álpozitív vagy álnegatív értékei mellett megbízhatóan jelezték a tumoros folyamatok alakulását, a malignitás kialakulását [42]. Prostatadaganatban szenvedő betegeket vizsgálva megfigyelték, hogy a vörösvértestekben mérhető metildonorraktárak csökkenése, a protoporfirin és a protoporfirin-Zn komplex szintjének növekedése a malignitást szignifikánsan jelezte. Ez felhívja a figyelmet a csökkent transzmetilezés és az uralhatatlan tumoros anémia kapcsolatára. A metilpool növelése érdekében céklaliofilizátum kiegészítő kezelést kaptak a taxánkezelte betegek. A betainban gazdag kezelés hatására mind a plazmában, mind az erythrocytában nőtt a szabadgyök-fogó kapacitás, emelkedett a KMMCs-szint is. Ezzel párhuzamosan csökkent a protoporfirin és a protoporfirin-Zn komplex koncentrációja. A céklaliofilizátum-szupplementáció azonban a betegek közel 40%-ában előnytelen volt az EGF és a prosztataspecifikus antigén (PSA) további, a korai állapothoz viszonyítva szignifikáns növekedése miatt [42, 43, 44].

A redox-homeosztázis biztosítja a szervezet szabadgyök-antioxidáns egyensúlyát, amelyet döntő mértékben a GSH redoxrendszer működése tart fenn. A GSH-reduktáz a szervezet oxidációs reakcióiban keletkezett oxidált GSH-t, a GSSG-t redukált nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát (NADPH) segítségével redukálja aktív GSH-vá. A reakcióhoz szükséges NADPH-t a glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz biztosítja a nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát (NADP) redukálásával. Így a GSH ismét be tud kapcsolódni a ciklusba, és a Se-dependens GSH-peroxidáz segítségével a H₂O₂-t vízre redukálja. A GSH ciszteinjének kénatomja viszont a transzmetilezés során képződő homociszteintől származik [15, 21].

A vizsgálatok alapján képet kaptunk néhány, a mindennapi életben is fogyasztható élelmiszer, illetve a patánykísérletben tapasztalt máj elzsírosodás következtében változó metilpooljáról. Az alimentáris eredetű májkárosodásban csökkent metilpool felhívja a figyelmet az elhízás és a rák kialakulása közötti kapcsolatban a metilezettségi szint jelentőségére [45, 46, 47].

Meghatározva a búza, a bab, a cékla és a káposzta KMMCs-tartalmát, megállapítható, hogy egységnyi nedves tömegre vonatkoztatva legjelentősebb könnyen mobilizálható metilpoolal a bab rendelkezik. (E kísérlettel csak a fajok, illetve a különböző növényi részek KMMCs-szintjei közötti különbséget kívántuk szemléltetni, és nem vettük figyelembe a fajták, a termőföld, a termesztési körülmények stb. eltéréseit, valamint nem száraz tömegre, hanem szövetnedves tömegre vonatkoztattunk.)

Megvizsgáltuk a nyúl- és a baromfimájak KMMCs-tartalmát is. Eredményeink alapján a baromfimáj me-

tilpoolja többszöröse a nyúlénak. (Ebben az esetben sem vettük figyelembe a fajták közötti eltéréseket, a tartási és egyéb feltételek miatti különbségeket.) A transzmetilezés és a redox-homeosztázis között megfigyelhető kapcsolat látható a májminták hidrogéndonor-aktivitásának és KMMCs-koncentrációjának változásaiból.

A nyúl-, baromfi- és patkánykísérletek eredményei rámutatnak a transzmetilezés és a redox-homeosztázis kapcsolatára. A patkánykísérletben tapasztalt emelkedett hidrogéndonor-aktivitás enyhe fokú májeltérésben a NADH-koncentráció növekedéséből adódik [48], azonban a KMMCs csökkent mennyisége rámutat arra, hogy fontos a bevitt tápanyagok diverzitása. A nem párhuzamos csökkenés hátterében a sejtek jobb energiaellátottsága, de elégtelen metildonorkészlete állhat. Ebből adódóan a zöldségek és gyümölcsök vitamin, polifenol, antocianin és más antioxidáns tulajdonságot hordozó bioaktív vegyületei mellett nagyobb figyelmet kell szentelni a metildonor vegyületekben gazdagabb élelmiszerek fogyasztására. A táplálkozási láncban keresztül, különösen a magvakból és állati belsőségekből is szervezetbe jutó kolin, betain és más metildonor vegyületek hozzájárulnak az emberi életminőség javításához, így azok a primer és szekunder prevenció nélkülözhetetlen elemei.

Köszönetnyilvánítás

Köszönetünket fejezzük ki *dr. Dinya Elek* oktatási dékánhelyettesnek (Egészségügyi Közszolgálati Kar, Semmelweis Egyetem) a statisztikai értékelésnél nyújtott segítségével.

Irodalom

- [1] *Cantoni, G. L.*: Activation of methionine for transmethylation. *J. Biol. Chem.*, 1951, 189, 745–754.
- [2] *Stead, L. M., Brosnan, J. T., Brosnan, M. E., et al.*: Is it time to reevaluate methyl balance in humans? *Am. J. Clin. Nutr.*, 2006, 83, 5–10.
- [3] *Mudd, S. H., Brosnan, J. T., Brosnan, M. E., et al.*: Methyl balance and transmethylation fluxes in humans. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2007, 85, 19–25.
- [4] *Laird, P. W., Jaenisch, R.*: DNA methylation and cancer. *Hum. Mol. Genet.*, 1994, 3, 1487–1495.
- [5] *Husztó, Z., Tyihák, E.*: Formation of formaldehyde from S-adenosyl-L[methyl-3H]methionine during enzymic transmethylation of histamine. *FEBS Lett.*, 1986, 209, 362–366.
- [6] *Zeisel, S. H., Mar, M. H., Howe, J. C., et al.*: Concentrations of choline-containing compounds and betaine in common foods. *J. Nutr.*, 2003, 133, 1302–1307.
- [7] *Szarka, E.*: Biochemical and genetic examinations of the general defense system of plants. PhD-thesis. [A növények általános védekezési rendszerének biokémiai és genetikai vizsgálata. Doktori disszertáció.] Budapesti Corvinus Egyetem, Budapest, 2008. [Hungarian]
- [8] *Trézl, L., Hullán, L., Szarvas, T., et al.*: Determination of endogenous formaldehyde in plants (fruits) bound to L-arginine and its relation to the folate cycle, photosynthesis and apoptosis. *Acta Biol. Hung.*, 1998, 49, 253–263.
- [9] *Sárdi, É., Stefanovits-Bányai, É.*: Relationship between peroxidase activity and the amount of fully N-methylated compounds in bean plants infected by *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*. *Acta Physiol. Plant.*, 2006, 28, 95–100. 523–528.
- [10] *Sárdi, É., Tordai, E.*: Determination of fully N-methylated compound in different cabbage and beetroot varieties. *Acta Biol. Szegediensis*, 2005, 49, 43–45.
- [11] *Szende, B., Tyihák, E., Kopper, L., et al.*: The tumour growth promoting effect of eta-N-trimethyl lysine. *Neoplasma*, 1970, 17, 433–434.
- [12] *Tyihák, E., Szende, B., Lapis, K.*: Biological significance of methylated derivatives of lysine and arginine. *Life Sci.*, 1977, 20, 385–392.
- [13] *Tyihák, E.*: Overpressured layer chromatographic methods in the study of the formaldehyde cycle in biological systems. *Trends Anal. Chem.*, 1987, 6, 90–94.
- [14] *Sárdi, É., Tyihák, E.*: Simple determination of formaldehyde in dimedone adduct form in biological samples by high performance liquid chromatography. *Biomed. Chromatogr.*, 1994, 8, 313–314.
- [15] *Tyihák, E., Trézl, L., Szende, B.*: Formaldehyde cycle and the phases of stress syndrome. *Ann. N. Y. Acad. Sci. USA*, 1998, 851, 259–270.
- [16] *Herrmann, W., Schorr, H., Bodis, M., et al.*: Role of homocysteine, cystathionine and methylmalonic acid measurement for diagnosis of vitamin deficiency in high-aged subjects. *Eur. J. Clin. Invest.*, 2000, 30, 1083–1089.
- [17] *Finkelstein, J. D., Kyle, W., Harris, B. J.*: Methionine metabolism in mammals. Regulation of homocysteine methyltransferases in rat tissue. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1971, 146, 84–92.
- [18] *Lever, M., George, P. M., Elmslie, J. L., et al.*: Betaine and secondary events in an acute coronary syndrome cohort. *PLoS One*, 2012, 7, e37883.
- [19] *Hogg, N.*: The effect of cyst(e)ine on the auto-oxidation of homocysteine. *Free Radic. Biol. Med.*, 1999, 27, 28–33.
- [20] *Blázovics, A.*: The differences in the redox-homeostasis and the impact of antioxidants in liver and gut diseases. Doctoral Dissertation. [A redox-homeosztázis változása és az antioxidánsok jelentősége máj- és bélbetegségekben.] MTA Doktora Pályázat, Budapest, 2005. [Hungarian]
- [21] *Ditscheid, B., Fünfstück, R., Busch, M., et al.*: Effect of L-methionine supplementation on plasma homocysteine and other free amino acids: a placebo-controlled double-blind cross-over study. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 2005, 59, 768–775.
- [22] *Detopoulou, P., Panagiotakos, D. B., Antonopoulou, S., et al.*: Dietary choline and betaine intakes in relation to concentrations of inflammatory markers in healthy adults: the ATTICA study. *Am. J. Clin. Nutr.* 2008, 87, 424–430.
- [23] *Niculescu, M. D., Zeisel, S. H.*: Diet, methyl donors and DNA methylation: interactions between dietary folate, methionine and choline. *J. Nutr.*, 2002, 132 (8 Suppl), 2333S–2335S.
- [24] *Key, T. J., Schatzkin, A., Willett, W. C., et al.*: Diet, nutrition and the prevention of cancer. *Public Health Nutr.*, 2004, 7, 187–200.
- [25] *Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., et al.*: Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951, 193, 265–275.
- [26] *Gersbeck, N., Schönbeck, F., Tyihák, E.*: Measurement of formaldehyde and its main generators in Erysiphe graminis infected barley plants by planar chromatographic techniques. *J. Planar. Chromatogr.*, 1989, 2, 86–89.
- [27] *Hatano, T., Kagawa, H., Yasuhara, T., et al.*: Two new flavonoids and other constituents in licorice root: their relative astringency and radical scavenging effects. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, 1988, 36, 2090–2097.
- [28] *Portela, A., Esteller, M.*: Epigenetic modifications and human disease. *Nat. Biotechnol.*, 2010, 28, 1057–1068.
- [29] *Ball, D. J., Gross, D. S., Garrard, W. T.*: 5-methylcytosine is localized in nucleosomes that contain histone H1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1983, 80, 5490–5494.

- [30] Greer, E. L., Shi, Y.: Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance. *Nat. Rev. Genet.* 2012, 13, 343–357.
- [31] Heit, R., Rattner, J. B., Chan, G. K., et al.: G2 histone methylation is required for the proper segregation of chromosomes. *J. Cell Sci.*, 2009, 122 (Pt 16), 2957–2968.
- [32] Gama-Sosa, M. A., Slagel, V. A., Trewyn, R. W., et al.: The 5-methylcytosine content of DNA from human tumors. *Nucleic Acids Res.*, 1983, 11, 6883–6894.
- [33] Christman, J. K., Weich, N., Schoenbrun, B., et al.: Hypomethylation of DNA during differentiation of Friend erythroleukemia cells. *J. Cell. Biol.*, 1980, 86, 366–370.
- [34] Dimala, E. S., Cheah, M. S., Rowitch, D., et al.: Extent of DNA methylation in human tumor cells. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1983, 71, 755–764.
- [35] De Bustros, A., Nelkin, B. D., Silverman, A., et al.: The short arm of chromosome 11 is a „hot spot” for hypermethylation in human neoplasia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, 85, 5693–5697.
- [36] Makos, M., Nelkin, B. D., Chazin, V. R., et al.: DNA hypermethylation is associated with 17p allelic loss in neural tumors. *Cancer Res.*, 1993, 53, 2715–2718.
- [37] Baylin, S. B., Makos, M., Wu, J. J., et al.: Abnormal patterns of DNA methylation in human neoplasia: potential consequences for tumor progression. *Cancer Cells*, 1991, 3, 383–390.
- [38] Berman, B. P., Weisenberger, D. J., Aman, J. F., et al.: Regions of focal DNA hypermethylation and long-range hypomethylation in colorectal cancer coincide with nuclear lamina-associated domains. *Nat. Genet.*, 2011, 44, 40–46.
- [39] Tyibák, E., Bocsi, J., Timár, F., et al.: Formaldehyde promotes and inhibits the proliferation of cultured tumour and endothelial cells. *Cell Prolif.*, 2001, 34, 135–141.
- [40] Bailey, E., Connors, T. A., Farmer, P. B., et al.: Methylation of cysteine is hemoglobin following exposure to methylating agents. *Cancer Res.*, 1981, 41, 2514–2517.
- [41] Robertson, K. D.: DNA methylation and human disease. *Nat. Rev. Genet.*, 2005, 6, 597–610.
- [42] Blázovics, A., Nyirády, P., Bekő, G., et al.: Changes in erythrocyte transmethylation ability are predictive factors for tumor prognosis in prostate cancer. *Croat. Chem. Acta*, 2011, 84, 127–131.
- [43] Blázovics, A., Szilvás, Á., Székely, Gy., et al.: Important bioactive molecules of erythrocytes in colorectal cancer patients after colectomy. *Open Med. Chem. J.*, 2008, 2, 6–10.
- [44] Blázovics, A., Nyirády, P., Romics, I., et al.: How can cancer-associated anemia be moderated with nutritional factors and how do Beta vulgaris L. ssp. esculenta var. rubra modify the transmethylation reaction in erythrocytes in cancerous patients? In: *Anemia*. Ed.: Silverberg, D. S. Tech Open Access Publisher, Rijeka, 2012, 93–114.
- [45] Calle, E. E., Rodriguez, C., Walker-Thurmond, K., et al.: Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N. Engl. J. Med.*, 2003, 348, 1625–1638.
- [46] Renehan, A. G.: Epidemiology of overweight/obesity and cancer risk. In: McTiernan, A. (ed.): *Physical Activity, Dietary Calorie Restriction, and Cancer*. Vol. 3. Energy balance and cancer. Springer, New York, 2011, 5–23.
- [47] Basen-Engquist, K., Chang, M.: Obesity and cancer risk: recent review and evidence. *Curr. Oncol. Rep.*, 2011, 13, 71–76.
- [48] Fromenty, B., Robin, M. A., Igoudjil, A., et al.: The ins and outs of mitochondrial dysfunction in NASH. *Diabetes Metab.*, 2004, 30, 121–138.

(Kleiner Dénes dr.,
Budapest, Üllői út 26., 1085
e-mail: deneskleiner@gmail.com)

Tisztelt Szerzőink, Olvasóink!

Az Orvosi Hetilapban megjelenő/megjelent közlemények elérhetőségére több lehetőség kínálkozik.

Rendelhető különnyomat, melynek áráról bővebben a www.akkrt.hu honlapon (kiadványok, folyóirat, különnyomat menüpontok alatt) vagy Szerkesztőségünkben tájékozódhatnak.

A közlemények megvásárolhatók pdf-formátumban is, illetve igényelhető Optional Open Article (OOpenArt).

Adott díj ellenében az online közlemények bárki számára hozzáférhetők honlapunkon (a közlemények külön linket kapnak, így más oldalról is linkelhetővé válnak).

Bővebb információ a hirdetes@akkrt.hu címen vagy különnyomat rendelése esetén a Szerkesztőségtől kérhető.