

Kísérletes hasnyálmirigy-gyulladás mágneses magrezonancián alapuló metabionomikai elemzése

Doktori értekezés

Bohus Eszter

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Noszál Béla egyetemi tanár, D. Sc.

Hivatalos bírálók: Dr. Ambrus Attila egyetemi adjunktus, Ph. D.
Dr. Berente Zoltán egyetemi docens, Ph. D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Bagdy György egyetemi tanár, D.Sc.
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Idei Miklós D. Sc.
Dr. Tóth Gábor egyetemi tanár, D. Sc.

Budapest
2011

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	4
1. Bevezető	6
2. Irodalmi háttér	8
2.1. Metabonomika	8
2.1.1. Nomenklatúra, történet	8
2.1.2. Adatgyűjtési módszerek	9
2.1.3. Az adatelemzés elvei és az alkalmazott módszerek fejlődése	15
2.1.4. Alkalmazási területek	19
2.1.5. Összegzés	22
2.2. A COMET kísérletsorozat	22
2.3. Exokrin hasnyálmirigy-gyulladást előidéző modelltoxinok	26
2.3.1. L-argininnel előidézett exokrin hasnyálmirigy-gyulladás	27
2.3.2. 1-ciano-2-hidroxi-3-buténnel előidézett exokrin hasnyálmirigy-gyulladás	28
2.3.3. Ceruleinnel előidézett exokrin hasnyálmirigy-gyulladás	29
3. Célkitűzések	31
3.1. Exokrin hasnyálmirigy-gyulladást előidéző modelltoxinok	31
3.2. Klaszterelemzésen alapuló módszer (CLASSY) fejlesztése metabonomikai adatok feldolgozására és az eredmények megjelenítésére	32
4. Módszerek	33
4.1. Kísérlettervezés, mintakezelés, mérési módszerek	33
4.1.1. A COMET méréssorozat kísérlettervezési protokollja	33
4.1.1.1. Mintagyűjtés	34
4.1.1.2. Szöveti és klinikai kémiai vizsgálatok	34
4.1.1.3. ¹ H NMR spektroszkópia	35
4.1.1.3.1. Vizeletminták	35
4.1.1.3.2. Szérumminták	35
4.1.1.4. Megjegyzések a kísérlettervezési protokollhoz	36
4.1.2. Az egyes kísérletek kísérlettervezésének további részletei	39
4.1.2.1. L-argininnel előidézett exokrin hasnyálmirigy-gyulladás	39
4.1.2.2. 1-ciano-2-hidroxi-3-buténnel előidézett exokrin hasnyálmirigy- gyulladás	39

4.1.2.3. Ceruleinnel előidézett exokrin hasnyálmirigy-gyulladás	40
4.1.2.4. Klaszteranalízisen alapuló adatelemző módszer (CLASSY)	40
4.2. Adatelemző módszerek	40
4.2.1. Exokrin hasnyálmirigy-gyulladást előidéző modelltoxinok vizsgálatához alkalmazott módszerek	40
4.2.1.1. Adatok előkészítése: normalizálás, a jelek kémiai eltolódásának igazítása, skálázás	41
4.2.1.2. Főkomponens-analízis (PCA).....	43
4.2.1.3. PLS (Projections to Latent Structures) és továbbfejlesztése	45
4.2.1.4. Statisztikai Totál Korrelációs Spektroszkópia (STOCSY).....	46
4.2.2. Az egyes kísérletek adatelemzésének további részletei	49
4.2.2.1. L-argininnel előidézett exokrin hasnyálmirigy-gyulladás.....	49
4.2.2.2. 1-ciano-2-hidroxi-3-buténnel előidézett exokrin hasnyálmirigy- gyulladás.....	50
4.2.2.3. Ceruleinnel előidézett exokrin hasnyálmirigy-gyulladás	50
4.2.3. Klaszteranalízisen alapuló adatelemző módszer (CLASSY)	51
5. Eredmények	53
5.1. Exokrin hasnyálmirigy-gyulladást előidéző modelltoxinok.....	53
5.1.1. L-argininnel előidézett exokrin hasnyálmirigy-gyulladás.....	53
5.1.1.1. Szövettan	53
5.1.1.2. Klinikai kémiai mérések és súlyadatok	54
5.1.1.3. Metabonomikai elemzés	58
5.1.1.4. „Röppályák” vizsgálata	64
5.1.2. 1-ciano-2-hidroxi-3-buténnel előidézett exokrin hasnyálmirigy-gyulladás	65
5.1.2.1. Szövettan	65
5.1.2.2. Klinikai kémiai mérések és súlyadatok	67
5.1.2.3. Metabonomikai elemzés	69
5.1.3. Ceruleinnel előidézett exokrin hasnyálmirigy-gyulladás	77
5.2. Klaszteranalízisen alapuló adatelemző módszer (CLASSY)	77
5.2.1. Klaszterezett korrelációk ábrája	77
5.2.2. „Heat map” ábrák	79
6. Megbeszélés	85

6.1. Exokrin hasnyálmirigy-gyulladást előidéző modelltoxinok.....	85
6.1.1. L-argininnel előidézett exokrin hasnyálmirigy-gyulladás.....	85
6.1.2. 1-ciano-2-hidroxi-3-buténnel előidézett exokrin hasnyálmirigy-gyulladás	89
6.1.3. Ceruleinnel előidézett exokrin hasnyálmirigy-gyulladás	90
6.2. Klaszteranalízisen alapuló adatelemző módszer (CLASSY)	91
6.2.1. Klaszterezett korrelációk ábrája	91
6.2.2. „Heat map” ábrák	92
7. Következtetések	96
7.1. Exokrin hasnyálmirigy-gyulladást előidéző modelltoxinok.....	96
7.1.1. L-argininnel előidézett exokrin hasnyálmirigy-gyulladás.....	96
7.1.2. 1-ciano-2-hidroxi-3-buténnel előidézett exokrin hasnyálmirigy-gyulladás	97
7.1.3. Ceruleinnel előidézett exokrin hasnyálmirigy-gyulladás	98
7.2. Klaszteranalízisen alapuló adatelemző módszer (CLASSY)	98
8. Összefoglalás	100
9. Summary	101
10. Hivatkozott irodalmak jegyzéke.....	102
11. Saját publikációk jegyzéke	121
12. Köszönetnyilvánítás.....	122

Rövidítések jegyzéke

2-DC	2'-dezoxicitidin
2-OG	2-oxoglutársav
3-HB	3-hidroxi-vajsav
4-CG	4-krezol-glükuronid
4-CS	4-krezol-szulfát
Ala	Alanin
ALP	Alkalikus foszfatáz
ALT	Alanin-aminotranszferáz
Arg	Arginin
AST	Aszpartát-aminotranszferáz
BUN	Szérum urea nitrogén
CE	Kapilláris elektroforézis
CHB	1-ciano-2-hidroxi-3-butén
CIT	Citromsav
COMET	Metabonomikai toxikológiai vizsgálatok céljából létrejött konzorcium ("Consortium for Metabonomic Toxicology")
CPMG	Carr-Purcell-Meiboom-Gill spin-echo NMR pulzusszekvencia
cre	Kreatin
crn	Kreatinin
Ctr	Citrullin
DMA	Dimetilamin
DMG	Dimetil-glicin
DRC	Gyógyszer vagy modelltoxin, és annak metabolitjai ("drug related compound")
GC	Gázkromatográfia
Gln	Glutamin
Glu	Glutaminsav
HIP	Hippursav
HPLC	Nagynyomású folyadékkromatográfia
HPPA	Hidroxi-fenil-propionsav
HSQC	Kétdimenziós heteronukleáris NMR mérés technika
Ile	Izoleucin
L-AA	L-aminoadipinsav
LC	Folyadékkromatográfia
Leu	Leucin
Lys	Lizin
MAS-NMR	Szilárd fázisú („magic angle spinning”) NMR mérés technika
MS	Tömegspektrometria
MVDA	Többváltozós adatelemzés
NAC	N-acetil-cisztein
NMNA	N-metil-nikotinsav
NMND	N-metil-nikotinsavamid
NMPY	N-metil-4-pirridon-5-karboxamid

NMR	Mágneses magrezonancia
O-PLS-DA	Ortogonalis szűrővel ellátott PLS diszkriminancia analízis
Orn	Ornitin
PA	Fenilecetsav
PAG	Fenil-acetil-glicin
PCA	Főkomponens-analízis
PEP	Foszfo-enol-piroszőlősav
Phe	Fenilalanin
PLS	Legkisebb négyzetek elvén működő projekciós módszer
PQN	Normalizálási módszer („Probabilistic Quotient Normalization”)
qPCR	Polimeráz láncreakción alapuló DNS meghatározási mód
RSPA	A spektrumok csúcsainak kémiai eltolódás ingadozását korrigáló módszer (“Recursive Segment-wise Peak Alignment”)
SHY	Statisztikai heterospektroszkópia
STOCSY	Statisztikai Totál Korrelációs Spektroszkópia
t-ac	<i>Transz</i> -akonitsav
TMAO	Trimetilamin- <i>N</i> -oxid
TOCSY	Kétdimenziós homonukleáris korrelációs NMR mérés technika
TSP	Nátrium-trimetilszilil-[2,2,3,3- ² H ₄]-propionát
Tyr	Tirozin
UPLC	Ultranagy nyomású folyadékkromatográfia
Val	Valin

1. Bevezető

Az 1980-as és 90-es évek robbanásszerű technológiai és informatikai fejlődése a molekuláris biológia egy új szemléletű területét hívta életre, a rendszerbiológiát. A gének, mRNS-ek, fehérjék és kismolekulák egyenkénti tanulmányozása helyett a genom, transzkriptom, proteom és metabolom nagyszámú képviselőjének egyszerre történő vizsgálata vált lehetségessé. A kutatás középpontjába hangsúlyozottan az élő szervezet molekuláris összetevőinek szövevényes kapcsolatrendszere, a kapcsolati háló felderítése került.

A rendszerbiológia, melyet a különböző ágak elnevezésének egységes végződése miatt röviden „omika”-ként is szoktak emlegetni, egy olyan kutatási stratégia, mely rendkívül nagyszámú adat gyűjtésén, majd az adatok fejlett matematikai és informatikai módszerekkel történő feldolgozásán alapul. Legfontosabb eleme, hogy nem, vagy nem feltétlenül hipotézisvezérelt. A nem célirányosan, előzetes elvárások nélkül gyűjtött adatok kiterjedt halmazában rejlő mintázatot, korrelációkat és trendeket ez a stratégia utólag, statisztikai alapon azonosítja. A felismert mintázatok segítségével végül vagy közvetlen választ ad a kísérlettel kapcsolatban feltett kérdésekre, vagy hipotézisek generálását segíti, melyek helyessége később költséghatékonyan, célirányos mérésekkel ellenőrizhető.

A megközelítés újszerűsége miatt a rendszerbiológiai szemléletű kutatási területek megszületésekor szinte azonnal komoly elvárások is kapcsolódtak az „omikákhoz”. Megcsillant a remény, hogy az új stratégia majd olyan multifaktoriális jelenségek megértésében segíti az orvostudományt, mint például a népbetegségek vagy tumor kialakulása, esetleg utat nyit az egyénre szabott gyógyszeres kezelés megvalósításához, vagy éppen a gyógyszerkutatás költségeinek drasztikus csökkenését eredményezi. A Scopus adattár irodalmi forrás keresője (a keresést Title/Abstract/Keyword kategóriákra szűkítve) a dolgozat megírásakor 47000 találatot mutatott „genomics” keresőszóra, 42000-t „proteomics” kifejezésre és 6000 forrást ajánlott fel „metabonomics/metabolomics” témában. Ez egy viszonylag fiatal tudományterületről még akkor is figyelemreméltó, ha a számok nyilvánvalóan jelentős torzításokat tartalmaznak. Az utolsó két évtized tapasztalata alapján ugyanakkor elmondható, hogy a módszerek egyelőre nem mindenben tudták beváltani a hozzájuk

fűzött reményeket. A „rendszer” bonyolultabbnak bizonyult, mint eredetileg gondolták. A rendszerbiológiát „túlértékeltként” minősítő kritikus megjegyzéseknek mégis megkérdőjelezhető az alapjuk. A fenti nagyszámú munka közül sok közvetlenül felhasználható, értékes eredményt hozott. Jelentőségük a hipotézisek generálásában, a kutatási irányok kijelölésében valószínűleg még nagyobb volt. Az „omika” területek nagy érdeklődésből és jól-finanszírozottságból fakadó gyors fejlődése pedig magával húzta a kapcsolódó eszköztár, elsősorban a kemometria, az adatgyűjtő technikák, a bioanalitika további fejlődését, melynek közvetett haszna nehezen becsülhető.

Ph.D. munkám jelentős részében exokrin hasnyálmirigy-gyulladást előidéző modelltoxinok hatásának komplex szövettani, klinikai kémiai és - mágneses magrezonancia-spektroszkópián alapuló - metabonomikai vizsgálatát végeztem. A munkám kezdetekor témavezetőmmel azt is célul tűztük ki, hogy a metabonomikát, mint ígéretes, és az Intézetünkben lévő analitikai eszközök jóvoltából Egyetemünkön is alkalmazható módszert a hazai kutatók szélesebb körében is ismertebbé tesszük. Tudomásom szerint egyelőre nem született metabonomikával foglalkozó magyar nyelvű összefoglaló írás, így dolgozatom következő fejezetében ennek a hiánynak a pótlására is szeretnék kísérletet tenni.

2. Irodalmi háttér

2.1. Metabonomika

2.1.1. Nomenklatúra, történet

A „metabolit” szó az angolszász szakirodalomban nemcsak „gyógyszermetabolitot” jelent, hanem minden olyan, jellemzően tíz szénatomszámúnál kisebb molekulát, amely a szervezet folyadéktereiben kiindulási anyagként, intermedierként vagy végtermékként részt vesz a biokémiai folyamatokban. Ilyenek például a citrátkör-intermedierek, a nukleotidok és aminosavak, azok lebomlási termékei, az egyszerű cukrok, a bélbaktériumainkkal közös anyagcseretermékeink, a kreatin, az urea, a hippursav stb. Dolgozatomban a továbbiakban alkalmazkodni fogok ehhez a nomenklatúrához és külön „toxin-metabolit”, „gyógyszermetabolit”, vagy „DRC” (drug related compound) kifejezésekkel utalok arra, ha egy xenobiotikum metabolitjairól van szó, és nem egy endogén kismolekuláról.

A bevezetőben említettek alapján a „metabonomika” a rendszerbiológia vagy más néven “omika” kutatási területek családjának azon tagja, mely a szervezet kompartmentjeiben és exkrétumaiban megtalálható, jellemzően kis molekulású anyagcsere intermedierek és termékek – az angolszász terminológiában “metabolitok” – szisztematikus koncentrációváltozásainak mintázatát vizsgálja. A klasszikus megközelítés helyett tehát, mely egy adott kismolekula reakcióira, kinetikai tulajdonságaira, biokémiai útvonalaira koncentrált, a metabonomika a biológiai folyadékok és szövetek kismolekula-összetételét egészében vizsgálja, és a fiziológiás, patológias hatások következtében beálló kvalitatív és kvantitatív változások összetett mintázata alapján próbálja leírni a háttérben párhuzamosan zajló biokémiai/életteni folyamatokat.

A '80-as évek legelején észlelték először, hogy szérum és vizelet NMR spektrumain a hatalmas vízjel mellett apró tüskék is láthatóak. Az alacsony térerő és a vízjelelnyomási technikák kezdetlegessége miatt ez akkoriban nem volt triviális felfedezés, annál is inkább, mert a minták eredetileg nehézfém-kötődési vizsgálatok céljából kerültek az NMR készülékbe. Hamar kiderült, hogy a jelek a biológiai folyadékok kismolekuláitól származnak, és hogy a kirajzolódó mintázat fajtól és

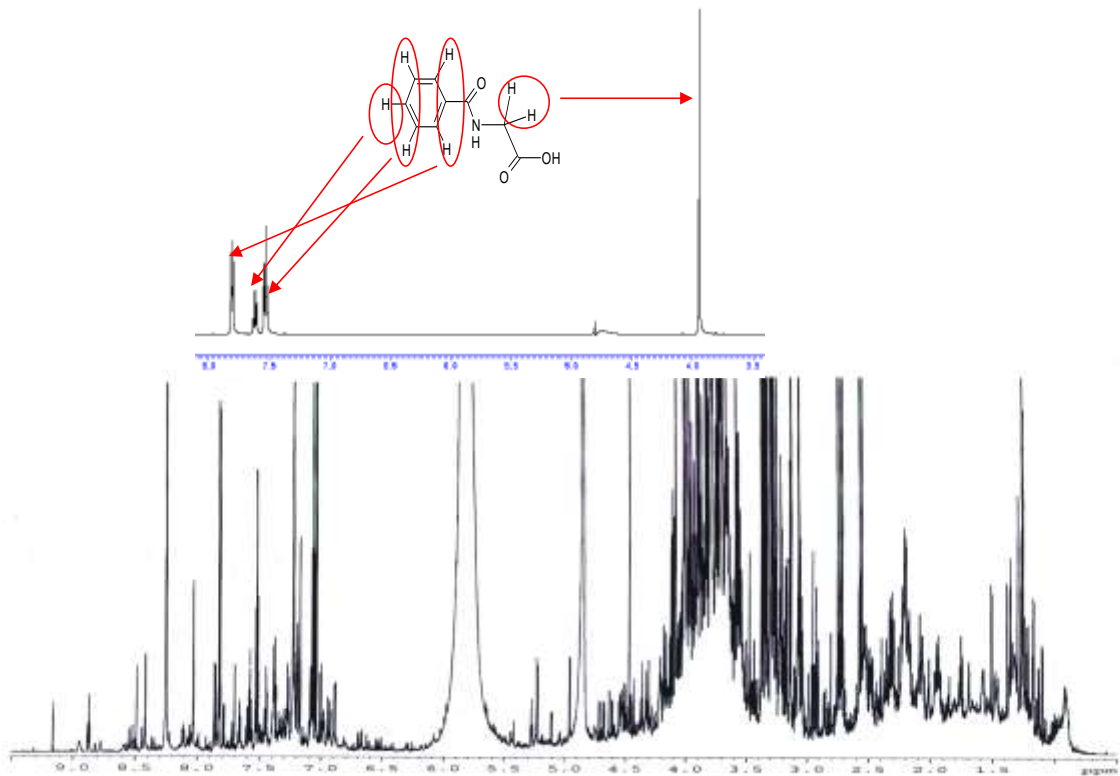
egyéntől függően nagyon különböző lehet [1]. A '80-as évek kutatásai nagyrészt a jelek azonosításáról és a különböző forrásokból származó biológiai minták különbségeinek vizuális feltérképezéséről szóltak [2]. Igaz, ekkor már végeztek toxikológiai vizsgálatokat is [3], ám az NMR spektrumok adatainak értékeléséhez a szofisztikáltabb, többváltozós adatelemzési statisztikákat (MVDA) csak a '90-es évek legelejétől kezdték alkalmazni [4,5]. A mintafelismerést támogató kemometriai módszerek bevezetésének hatására a '90-es években a témában megjelenő publikációk száma meredeken emelkedni kezdett. Ennek ellenére a módszer, és a benne rejlő lehetőségek csak a szűkebb szakmai kör számára voltak ismertek, amihez az is hozzájárulhatott, hogy a kutatási területnek még nem volt önálló neve. A későbbiekben két olyan csoport, mely élen járt az ilyen irányú vizsgálatokban, egymástól függetlenül a „metabonomika” illetve a „metabolomika” nevet adta a módszereknek, nem kis zavart okozva ezzel a területtel újonnan ismerkedő kutatók egyre szélesedő körében. A szelíd rivalizálás eredményeként több soron át húzódó definíciók születtek, mellyel megpróbálták egymástól a két kifejezést valahogy megkülönböztetni [6,7], sőt az irodalomban megjelentek a „metabolic profiling” és „metabolic fingerprinting” elnevezések is, tovább növelve a káoszt a nomenklatúrában. Mára azt hiszem, nyugodtan kijelenthető, hogy nincs érdemi különbség e kifejezések jelentése között, és lényegében mindegyik az előző bekezdésben leírt célokat és stratégiát takarja. A Ph.D. munkám jelentős része a londoni Imperial College Biomolecular Medicine tanszékének és Jeremy K. Nicholson professzornak a segítségével, és az ő mérési adataik felhasználásával készült, így dolgozatomban az általuk preferált „metabonomika” elnevezést fogom használni.

2.1.2. Adatgyűjtési módszerek

A metabonomikának speciális jellemzője a többi „omikához” képest, hogy egyetlen analitikai technikával egyelőre nem vizsgálható a mintában lévő kismolekulák teljes köre. Ennek oka egyrészt, hogy az átölelendő koncentrációtartomány nagyon széles, másrészt hogy fizikai és kémiai tulajdonságok szempontjából a metabolom rendkívül sokszínű. Bármilyen technikát választunk is tehát, mindig csak egy szegmensét látjuk a kismolekulák teljes palettájának és erre már a mérési módszer tervezésénél gondolni kell [8].

A rendelkezésre álló számtalan analitikai technika közül [9] metabonomikai vizsgálatokhoz elsősorban azok terjedtek el, melyek a kvantitatív információ mellett képesek az elemzőt a kismolekulák azonosításához szükséges pontos szerkezeti információval is közvetlenül ellátni. Jelenleg a folyadékkromatográfiával (LC/HPLC/UPLC) kapcsolt tömegspektrometria (MS) szolgáltatja a legszélesebb képet egy minta kismolekula-összetételéről [10], míg a mágneses magrezonancia-spektroszkópia (NMR) a kiváló reprodukálhatósággal vívott ki vezető szerepet a metabonomikában. A kétféle adatgyűjtő technika néhány alapvető tulajdonsága röviden összefoglalható: a) Az NMR nem igényli a biológiai folyadékok komponenseinek előzetes elválasztását, a tömegspektrometriai mérést viszont jellemzően gázkromatográfia (GC), folyadékkromatográfia (LC/HPLC/UPLC) vagy kapilláris elektroforézis (CE) előzi meg [11]. b) Az egy mintára jutó mérésidő összemérhető, mindkét módszernél 5-10 perc között van. Mindkét esetben automatizálható a mintaadagolás és a mérés, és az egy mintára eső költség (legalább is a többi „omikához” képest) relatíve alacsony. c) Az NMR mintaigénye lényegesen nagyobb, mint az MS méréseké, általában kb. 0,5 ml szemben a néhány μ l-rel. Igaz, léteznek anyagigényt csökkentő NMR technikák, ezek ára azonban nagyszámú minta rutinszerű mérését még nem mindig teszi kifizetődővé. d) A minta az NMR-es mérés után ép marad és alkalmas további vizsgálatokra, míg tömegspektrometriánál természetesen elvész. e) A leglényegesebb különbség a két módszer között az érzékenységben és a reprodukálhatóságban van. Ma már nem ritkák a 800 MHz-es protonfrekvenciájú kriofejes NMR készülékek, és ennél magasabb térerővel rendelkező berendezések is vannak, mégis, egy átlagos („kontroll”) mintában a detektálható kismolekulák száma legfeljebb néhány száz. UPLC-MS méréseknél a jelek száma meghaladhatja a tízezret, és bár ezek jelentős részét még nem sikerült azonosítani, sejthető, hogy a detektált metabolitok száma is nagyságrendekkel nagyobb, mint az NMR-nél. Ugyanakkor a későbbiekben ismertetendő COMET vizsgálatok előkészítő mérései igazolták, hogy a biológiai minták NMR spektrumában tapasztalható eltérés 1,6% alatt marad különböző műszereket használva ugyanannak a mintának a vizsgálatához [12]. Az MS-alapú metabonomikai mérések reprodukálhatósága, részben a mérést megelőző kromatográfias elválasztásnak köszönhetően, ettől lényegesen elmarad.

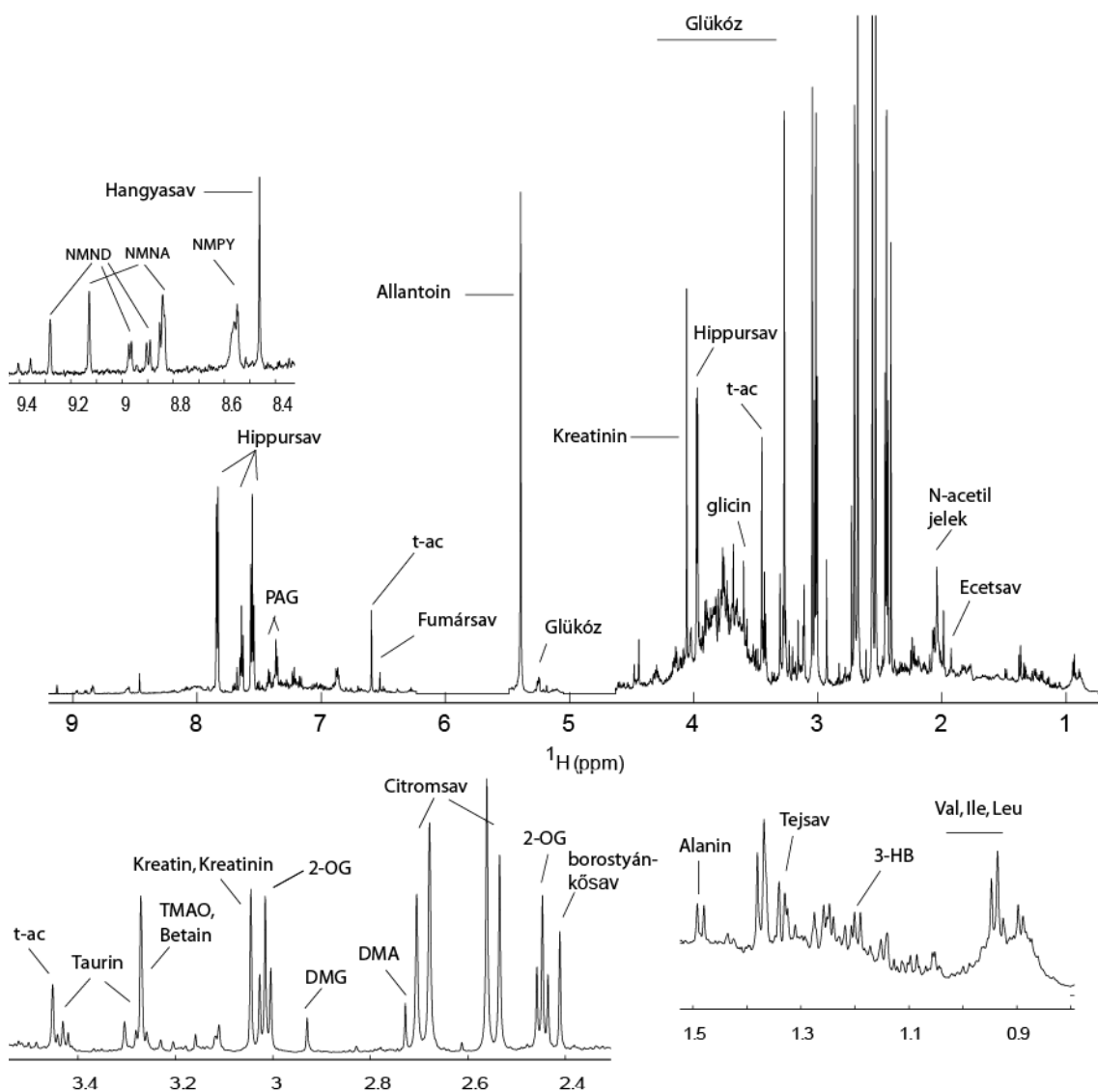
Ph.D. munkám alapjául NMR spektroszkópiával gyűjtött adatok szolgáltak, így példaként ennek a módszernek a jellemzőit foglalom össze nagyon röviden. Az NMR méréseknél a vizsgált anyagban lévő mágneseszen aktív magoktól érkező jeleket detektáljuk. Legegyszerűbb és legelterjedtebb, rutinszerűen alkalmazott formája az ^1H NMR spektroszkópia, ahol tehát a minta hidrogén atommagjait vizsgáljuk. A spektrumon látható jelek pozíciója (kémiai eltolódás értéke, mértékegység: ppm), és felhasadási mintázata a protonok kémiai környezetétől függ, melyet a hidrogén atom elektronfelhőjének szerkezete, a szomszédos atomokkal létesített kölcsönhatásai határoznak meg elsősorban (1. ábra).



1. ábra. A biológiai minták NMR-spektruma (pl. vizelet - alsó ábra) a mintában lévő kismolekulák egyedi spektrumának (pl. hippursav - felső ábra) összege. A jelek görbe alatti területe az adott metabolit koncentrációjával arányos.

A kapcsolat a spektrum mintázata és a kémiai környezet között kellően szoros ahhoz, hogy a jelek alapján a vizsgált anyag szerkezete nagy biztonsággal felírható legyen. (Kétségek esetén pedig további ú.n. kétdimenziós méréseket lehet segítségül hívni.) A biológiai minták NMR spektruma a mintában lévő kismolekulák egyedi spektrumának összege (1. ábra), és a jelek görbe alatti területe az adott metabolit koncentrációjával

arányos. A spektrum tehát nemcsak az azonosítást segítő kvalitatív, hanem pontos mennyiségi információ forrása is. A mintában lévő nagyszámú kismolekulától származó jelhalmaz zsúfolt és átfedésekkel terhes, azonban többváltozós adatelemzési módszerekkel így is értékelhető, nem szükséges a komponensek előzetes szétválasztása. A 2. és 3. ábrán egy kontroll csoporthoz tartozó patkány vizelet- és szérummintájának ^1H NMR spektruma látható. A későbbi tájékozódás megkönnyítéséhez az 1. és 2. táblázatban összefoglaltam a legjellegzetesebb jelek kémiai eltolódás értékeit és multiplicitását.

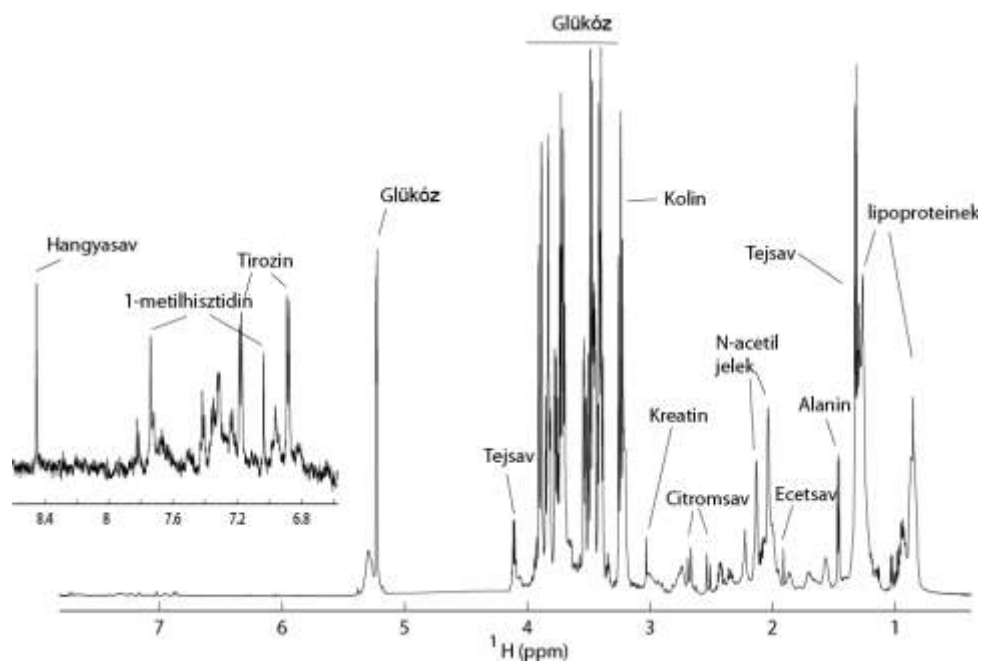


2. ábra. Kontroll csoporthoz tartozó Sprague-Dawley patkánytól származó vizelet 600 MHz-es készülékkel felvett ^1H NMR spektruma, kinagyított részletekkel. Jelmagyarázat: Val, valin; Leu; leucin; Ile, izoleucin; 2-OG, 2-oxoglutársav; PAG, fenil-acetil-glicin; 3-HB, 3-hidroxi-vajsav; NMND, *N*-metil-nikotinamid; NMNA, *N*-metil-nikotinsav; NMPY, *N*-metil-4-pirridon-5-karboxamid; t-ac, *transz*-akonitsav; TMAO, trimetilamin-*N*-oxid; DMA, dimetilamin; DMG, dimetil-glicin

metabolit	kémiai eltolódás (ppm)	multiplicitás	metabolit	kémiai eltolódás (ppm)	multiplicitás
NMND	9,28	s	Hippursav	3,97	d
NMNA	9,13	s	Kreatin	3,93	s
NMND	8,97	d	Betain	3,91	s
NMND	8,90	d	PAG	3,76	d
NMNA	8,84	m	DMG	3,72	s
NMPY	8,55	s	PAG	3,68	s
Hangyasav	8,46	s	Glicin	3,57	s
NMNA	8,08	m	t-ac	3,45	s
Benzoésav	7,88	d	Taurin	3,42	t
Hippursav	7,84	d	Taurin	3,27	t
2-DC	7,81	d	TMAO, Betain	3,27	s
Hippursav	7,64	t	Kreatin, Kreatinin	3,05-3,04	s
Hippursav	7,55	t	2-OG	3,01	t
PAG	7,44-7,40	m	DMG	2,93	s
PAG	7,36	m	3-HPPA	2,84	t
4-CS	7,29	d	4-HPPA	2,80	t
3-HPPA	7,25	m	DMA	2,72	s
4-CG	7,23	d	Citromsav	2,72-2,65	d
4-CS	7,21	d	Metilamin	2,61	s
4-HPPA	7,17	d	Citromsav	2,58-2,52	d
4-CG	7,05	d	2-OG	2,45	t
4-HPPA	6,87	d	Borostyánkősav	2,41	s
3-HPPA	6,86	m	4-CS	2,345	s
3-HPPA	6,80	s	4-CG	2,30	s
3-HPPA	6,76	m	2-AA	2,24	t
t-ac	6,60	s	Vajsav	2,16	t
NMPY	6,56	t	N-acetil jelek	2,02-2,05	s
Fumársav	6,53	s	Ecetsav	1,925	s
2-DC	6,275	t	Vajsav	1,56	tq
Allantoin	5,40	s	Alanin	1,48	d
Glükóz	5,23	d	Tejsav	1,33	d
4-CG	5,085	d	3-hidroxi-vajsav	1,21	d
Glükóz	4,65	d	Valin	1,045	d
NMND	4,48	s	Izoleucin	1,01	d
NMNA	4,44	s	Valin	0,99	d
Almasav	4,32	dd	Leucin, Izoleucin	0,95	d
Tejsav	4,11	q	Alfa-keto-izovaleriánsav	0,94	d
Kreatinin	4,06	s	Vajsav	0,9	t

1. táblázat Néhány jellegzetes, könnyen azonosítható jel hozzárendelése (asszignáció) Sprague-Dawley patkánytól származó vizeletminta ¹H NMR spektrumán. Jelmagyarázat: 2. ábra; HPPA, hidroxi-fenil-propionsav; 4-CG, 4-krezol-glükuronid; 4-CS, 4-krezol-szulfát; 2-DC, 2'-deoxicitidin; L-AA, L-amino-adipinsav;

Szérum



3. ábra. Kontroll csoporthoz tartozó Sprague-Dawley patkánytól származó szérum 600 MHz-es készülékkel felvett ^1H NMR spektruma, kinagyított részlettel.

metabolit	kémiai eltolódás (ppm)	multiplicitás		metabolit	kémiai eltolódás (ppm)	multiplicitás
Hangyasav	8,46	s		DMG	2,93	s
2-DC	7,81	d		DMA	2,73	s
1-metil-hisztidin	7,77	s		Citromsav	2,72-2,65	d
Tirozin	7,18	d		Citromsav	2,58-2,52	d
1-metil-hisztidin	7,05	s		Piroszőlősav	2,36	s
Tirozin	6,89	d		Acetecetsav	2,22	s
2-DC	6,275	t		N-acetil jelek	2,02-2,05	m
PEP	5,39	s		Ecetsav	1,925	s
Glükóz	5,23	d		Lizin	1,91	m
PEP	5,18	s		Lizin	1,73	m
Glükóz	4,64	d		Lizin	1,48	m
Tejsav	4,11	q		Alanin	1,48	d
Kreatin	3,93	s		Tejsav	1,33	d
Glicin	3,57	s		Valin	1,045	d
TMAO	3,27	s		Izoleucin	1,01	d
Kolin, Foszfokolin	3,20	s		Valin	0,99	d
Kreatin	3,05-3,04	s		Leucin, izoleucin	0,95	t
Lizin	3,03	t				

2. táblázat Néhány jellegzetes, könnyen azonosítható jel asszignációja Sprague-Dawley patkánytól származó szérummintán ^1H NMR spektrumán. Jelmagyarázat: 2. ábra; PEP, foszfo-enol-piroszőlősav

Végül még egyszer hangsúlyozni szeretném, hogy az egydimenziós ^1H NMR spektroszkópia csak a legegyszerűbb lehetőség. A metabonomikai elemzés alapulhat bonyolultabb pulzusszekvenciával, vagy kétdimenziós technikákkal nyert adatokon [13], továbbá egyéb NMR-aktív magok pl. ^{13}C , ^{19}F , vagy ^{31}P stb. mérésén is [14-16]. Bár nem feltétel a komponensek előzetes szétválasztása, kapcsolt technikák alkalmazása (LC-NMR, CE-NMR, LC-NMR-MS) itt is segítheti a információ még teljesebb kiaknázását [17-19].

2.1.3. Az adatelemzés elvei és az alkalmazott módszerek fejlődése

A metabonomikát a rendszerbiológia nevű csoport méltó tagjává a mintafelismerő adatelemzési módszerek alkalmazása és fejlesztése emelte. A más néven „adatbányászó”, vagy „data mining” stratégia teszi lehetővé, hogy az elemző egy kísérletben ne csak a metabolom egy-egy kiragadott képviselőjét tanulmányozza, hanem a kismolekulákról rendelkezésre álló teljes információt feldolgozza, és akár előzetes hipotézis nélkül, az adatok gyűjtése után szűrje ki a kísérlet szempontjából fontosnak bizonyuló metabolitok körét. Megjegyzendő, hogy a koncentrációváltozásokat nem mutató kismolekulák feltérképezése legalább ennyire hasznos a háttérben zajló biokémiai folyamatok értelmezéséhez, és ez az információ az adathalmazban szintén bőségesen rendelkezésre áll. Rendszerszemléletűvé tehát akkor válik az elemzés, ha a gyűjtött adatok teljes, csonkítatlan, vagy csak alapos indokkal csonkított palettájának egyszerre történő értékelésével keresünk választ néhány alapvető kérdésre: a) A vizsgált minták között vannak-e különbségek, szétesik-e spontán a mintahalmaz alcsoportokra? b) Ha igen, a csoportokba rendeződés köthető-e valamilyen előzetes ismerethez, pl. beteg/egészséges egyéntől származó, kezelt/nem kezelt egyéntől származó, vagy a gyógyszer beadása előtről/utánról származó minták? c) Mely metabolitok koncentrációjának milyen irányú és mértékű változása felelős a csoportok elkülönüléséért? Tudunk-e azonosítani biomarkert vagy biomarkereket, esetleg több endogén kismolekula együttes koncentrációváltozása mutat-e olyan jellegzetes mintázatot, amely „biomarkernek” tekinthető? d) Mely kismolekulák időbeli és koncentrációbeli változása korrelált, milyen mértékű ez a korreláltság, mely biokémiai/élettani folyamat kapcsolja össze a szervezetbeli sorsukat? e) A mintákkal

kapcsolatos előzetes ismereteinken túl találunk-e alcsoportokat például a válaszadás erőssége, időbeli lefutása alapján?

A többváltozós adatelemzés elvi matematikai alapjainak leírása már 1900 körül megjelent filozófiai és matematikai folyóiratokban. Többek között Karl Pearson végzett úttörő munkát ezen a területen [20]. A bonyolult számítások segédeszközök nélkül azonban időigényesek voltak, így a módszer megmaradt matematikusok szűk körében ismert elvi lehetőségként. A gyakorlati alkalmazáshoz a számítógépek fejlődése nyitott utat, és kezdetben elsősorban gazdasági-politikai kérdések megválaszolásához, tendenciák elemzéséhez hívták segítségül.

A '90-es években a biológiai folyadékok ^1H NMR spektrumainak értékelésénél még elkerülhetetlen volt az adatredukció, így 0,04 ppm-es szegmensekre („spectral bin/bucket”) bontott spektrumokból dolgoztak. A kereskedelmi forgalomban akkor kapható általános mintafelismerő programok használatához egyéb fáradságos adatelőkészítő lépésekre is szükség volt, és az eredmények interpretálása komoly felkészültséget igényelt mind az NMR spektroszkópia, mind a többváltozós statisztika területén. Ennek ellenére a rendelkezésre álló matematikai módszerek széles körét próbálták ki metabonomikai mérésekből származó adatokon, részletesen feltérképezve azt is, hogy milyen korlátokkal vagy apróbb módosításokkal alkalmazhatók. (Néhány példa: 3. táblázat, részletes ismertetés: Lindon et al. 2001. [21]). Gyakran hangsúlyozták ebben az időszakban a metabonomikai témában született írásokban az MVDA-nak azt az előnyét, hogy segítségével a minta klasszifikációja, csoporthoz sorolása (pl. beteg vagy egészséges egyéntől származó) akkor is robusztusan megoldható, ha a csoportok szétválásának okai nem deríthetők fel vagy magyarázhatóak teljes biztonsággal. Ez kétségtelenül igaz, a megjegyzés háttérben mégis inkább az állt, hogy az akkor legnépszerűbbé váló főkomponens-analízis (PCA) és PLS-elemzés, mint projekciós módszerek egyszerű formáikban gyakran komoly torzításokat hordoztak magukban, így az ok-okozati összefüggések valóban nem mindig voltak egyértelműen felderíthetők.

Nem-irányított (Lineáris/Nem-lineáris)	Irányított (Lineáris/Nem-lineáris)
<ul style="list-style-type: none"> • Főkomponens-analízis (Principal Component Analysis – PCA) • Faktoranalízis (FA) • Nemlineáris térképek (Non-linear Mapping – NML) • Hierarchikus csoportelemzés (Hierarchical Cluster Analysis - HCA) 	<ul style="list-style-type: none"> • Legkisebb négyzetek regresszió (Partial Least Squares - PLS) • Kanonikus diszkrimináns faktorelemzés (Canoical Variate Analysis – CVA) • Osztályanalógiák közvetett elmezése (SIMCA) • Főkomponens regresszió (Principal Component Regression - PCR) • Nemlineáris iteratív PLS (NIPALS) • Mesterséges ideghálózatok (Artificial Neural Network – ANN) • Bayes hálók (PNNs, CLOUDS) • Genetic Programming

3. táblázat. Néhány példa metabonomikai vizsgálatokhoz alkalmazható kemometria módszerekre.

A következő, talán nevezhetjük „második generációs” módszereknél az értelmezhetőség javítása volt az egyik központi törekvés. 2005 körül tértek át a metabonomikával foglalkozó kemometrikusok olyan sokoldalú, szofisztikált matematikai szoftverek használatára, melyek lehetővé tették, hogy célzottan, metabonomikai kísérletekből származó adatok elemzésére szabott programokat írjanak. Ezek a programok, szkriptek négy szempontból jelentettek lényeges újítást: Képesek voltak a teljes spektrális terület analízisére, mely minőségi különbséget jelentett a korábbiakhoz képest. Figyelembe vették az adatgyűjtéshez használt analitikai módszer sajátosságait és az adott biológiai minta természetét, így lehetővé tették számtalan adatelőkészítési lépés automatizálását [22,23]. A modellek robusztusabbakká, a kiszűrt eredmények pedig könnyebben értelmezhetőkké váltak (O-PLS [24,25]). Korrelációanalízis segítségével nagyszámú minta esetén statisztikai alapon fényt lehetett deríteni biokémiaileg együtt szabályozott, ko-regulált metabolitok csoportjaira (STOCSY [26]), sőt ugyanazon minta különböző analitikai módszerekkel nyert spektrumainak korreláltatására is lehetőség nyílt (SHY [27]). Bár ezek a „második generációs” metabonomikai programok még megkövetelték az elemző jártasságát mind az adatgyűjtési, mind az alkalmazott adatelemzési módszer területén, lényegesen

felhasználóbarátabbak voltak a korábbiaknál és tizedére csökkentették a kísérlet eredményeinek értékelésére fordítandó időt és energiát.

Az utóbbi évek „harmadik generációs” programjainak célja, hogy az elemzőt teljesen mentesítsék az adatelőkészítési lépések alól, és az eredmények értelmezéséhez a felhasználónak lehetőség szerint egyáltalán ne legyen szüksége NMR-spektroszkópiával vagy statisztikai módszerekkel kapcsolatos ismeretekre [28]. Megmaradt ugyanakkor az igény az adatokban rejlő összes összefüggés maradéktalan kiaknázására, ami viszont gyakran igen bonyolult, nehezen áttekinthető és nem feltétlenül felhasználóbarát ábrákhoz vezet [29]. Az ésszerű kompromisszum megtalálása jelenti most az egyik legnagyobb kihívást a kemometriai fejlesztés területén, és a megoldást a jövőben valószínűleg a gyors, interaktív felhasználói felületekkel működő szoftvercsomagok fogják jelenteni. Itt, a „harmadik generációs” módszereknél említendő meg a „targeted profiling” elven alapuló metabonomikai elemző stratégia is [30], melyet exploratív kutatásokban hosszú ideig mellőztek. A módszer a komponensek mennyiségi meghatározásának nagyfokú pontosságát teszi lehetővé, ám alkalmazhatóságának korlátot szab, hogy adatbázis kiépítését és használatát igényli. Az adatbázisok tökéletesedésével és információtartalmuk növekedésével azonban ez a stratégia is várhatóan szélesebb körben terjedni fog.

A szakirodalomban (talán a nevezéktan és a definíciók körüli zavar következményeként) előfordul, hogy miután egy kutató a hipotézisének teszteléséhez néhány célzottan kiválasztott kismolekula koncentrációját NMR vagy tömegspektrometriai méréssel meghatározta, vizsgálatát „metabonomikai szemléletűnek” minősíti, kulcsszóként feltüntetve valamelyik „omika” végződésű elnevezést a publikációban. Ilyen jellegű „metabolit koncentráció meghatározásra” mindkét analitikai módszer kiválóan alkalmas, és ezek a mérések természetesen nagyon hasznos kiegészítői egyéb vizsgálatoknak. Elvükben azonban nem különböznek egy laboratóriumi vércukorszint-méréstől, csak az alkalmazott technika tűnik modernebbnek. Mivel tehát az elemző nagy valószínűséggel így csak a töredékét dolgozta fel a kismolekulák szintjén lejátszódó eseményeknek, az „omika” végződés a „metabolit” szóval kapcsolva túlzónak tűnik, a publikáció pedig ebből a szempontból csalódást okozhat az olvasóknak.

2.1.4. Alkalmazási területek

A biológiai folyadékok kismolekula-összetételének mérése elsőként a gyógyszerkutatás toxikológiai vizsgálati fázisában nyert szélesebb körben alkalmazást. Ezt a felhasználási területet a következő fejezetben szeretném részletesebben bemutatni, itt csak az egyéb, orvostudományokhoz köthető lehetőségekről adok rövid áttekintést. A dolgozathoz teljesen kimarad a metabonomika legalább ennyire szerteágazó növényteni [31], élelmiszerbiztonsági [32], környezetvédelmi és környezeti-toxicológiai [33] alkalmazási területeinek bemutatása.

A metabonomikában oly gyakran használt „biológiai folyadék” kifejezés legtöbbször vér- és vizeletmintákat takar, hiszen, mint a szervezetünk legfontosabb közvetítő közege és a homeosztázis fenntartásában legfontosabb exkrétum ezek szolgáltatják a legszélesebb képet az egyén egészségi állapotáról. A mintavétel mindkét folyadéknál rutinszerű, és az orvosi laboratóriumok szokásos klinikai kémiai vizsgálatai könnyen egészíthetők ki kutatási céllal a már rendelkezésre álló minták NMR vagy tömegspektrometriás mérésével. A vér- és vizeletminták elemzésén alapuló vizsgálatok mellett azonban specifikus kórképek tanulmányozásánál szép számmal található az irodalomban epe [34], gerincvelői folyadék [35], ejakulátum [36], nyál [37], szemfolyadékok [38], magzatvíz [39], stb. kismolekula-összetételének vizsgálatával foglalkozó publikáció is.

A metabonomika megszületésekor még előfeltétele volt az NMR méréseknek, hogy a minta folyékony halmazállapotú legyen, így szövetek, sejt kultúrák kismolekula-összetételéről csak extraktum készítése után lehetett (némiképp torzított) képet formálni. A „magic angle spinning” (MAS) NMR mérés technika fejlődésének köszönhetően ma már intakt szövetek, sejt kultúrák metabolit-összetétele is jó felbontású spektrumok segítségével vizsgálható [40]. Ez újabb távlatokat nyitott meg mind a toxikológiai mind a diagnosztikai alkalmazásokban, hiszen a különböző kompartmentek spektrumainak korrelációs elemzésén keresztül a metabolitok koncentrációváltozásai az érintett szervek szöveteitől a keringésen át a vizeletig térben és időben is követhetővé vált. („Integrated metabonomics” [41,42]).

A klinikai alkalmazások területén kiemelendő a veleszületett anyagcsere-rendellenességek gyors és pontos diagnosztikája. Engelke és munkatársai több kiadást

megélt kézikönyve ^1H NMR spektrumokkal, rövid magyarázattal és a hibás biokémiai útvonal vázlatos felrajzolásával segíti az orvosok munkáját [43]. Több nyugat-európai országban a társadalombizosítás fontolóra vette a szűrővizsgálat finanszírozását is. Sajnos ettől egyelőre távol van számtalan olyan betegségcsoport, ahol a metabonómia már régóta bizonyította sokoldalú gyakorlati hasznát és alkalmazhatóságát akár a prevencióban, akár a beteg állapotának vagy a terápia hatékonyságának monitorozásában. A teljesség minden igénye nélkül talán a diabeteszes [44-47], különböző vesebetegségek [48-50], transzplantáció [51-53] ragadhatók ki példaként. A már említett szilárd fázisú NMR felhasználási lehetőségeit a legintenzívebben tumordiagnosztikában és terápiában kutatják [54-56], bár ezen a területen úgy tűnik, magyar kutatók (Takáts et al. [57,58]) „omika” elven alapuló ígéretes találmánya veszi át a vezető szerepet. Az intelligens sebészkes a szövetek vágása közben keletkező ionizált részecskéket tömegspektrometriás detektorhoz továbbítja. A felvett spektrum jeleiből kirajzolódó mintázat szövetspecifikus, így műtét közben az orvos folyamatos, pontos információt kaphat a vágott szövet összetételéről. Elsődleges felhasználási területnek tumoros betegek műtétei tűnnek, ezért az eszközt gyakran onkokészként is emlegetik, de a megfelelő spektrális adatbázis kiépítésével az idegsebészettől a plasztikai sebészetig az eszköz számtalan típusú műtéti beavatkozást támogatni tud majd.

A '90-es évek végén több ezer önkéntes bevonásával kezdődött meg az első humán populációs metabonómiai vizsgálat, melynek alapjául Japánban, Kínában, Nagy-Britanniában és az Egyesült Államokban gyűjtött vizeletminták szolgáltak. (INTERMAP mérésorozat [59]). Mára a biobankok működésének eredményeként a genomra kiterjedő asszociációs vizsgálatok (Genome-wide association study, GWAS) mintájára metabolomra kiterjedő asszociációs vizsgálatokat is végeznek (Metabolome-wide association study, MWAS), remélve, hogy ezen keresztül közelebb kerülhetünk a népbetegségek kockázati tényezőinek feltérképezéséhez, és a lakosság szűrésére alkalmas eszköz fejlesztéséhez [60-62].

Az egyénre szabott gyógyszeres kezelés megvalósításához a tudományterület eddig a farmako-metabonómia elvének bizonyításával [63,64] és a bélflóra-összetétel és működés jelentőségének részletes vizsgálatával járult hozzá [65-68]. A „metabotípus” meghatározása hasznosnak bizonyult mutáns, transzgenikus állatok

tulajdonságainak feltérképezésében, és támogatja a humán betegségek állatkísérletes modelljeinek validálását is [69-71].

A rendszerbiológiai kutatások végső célja, hogy az élő szervezetben a gének, fehérjék és kismolekulák szintjén történő eseményeket egységes rendszerben lehessen értelmezni. A szervezetben zajló metabolit-fluktuációk a génexpresszió, fehérje expresszió, környezeti hatások stb. interakciójának végeredményei, így a metabonomika, mint az „omika” kaszkád utolsó, fenotípushoz legközelebb álló pontja ígéretes koordinátora az „omika”-területek eredményeinek integrált elemzését célul kitűző vizsgálatoknak („Top-down systems biology”) [67,72-74].

A metabonomika alkalmazásának terjedését némiképp fékezte két olyan sajátossága, melyet csak lassan sikerült elfogadtatni a kutatói társadalommal. A stratégia exploratív jellegéből adódóan nagyon nehéz, és nem is feltétlenül helyes előre célkitűzéseket és elvárásokat megfogalmazni egy metabonomikai mérésrel kapcsolatban, hiszen nincsen garancia arra, hogy a kísérlet a céljainknak megfelelő eredményekre vezet, ugyanakkor nagy az esélye annak, hogy a várakozásoktól merőben eltérő, értékes összefüggésekre derüljön fény. Azt tehát, hogy egy metabonomikai vizsgálat elvégzésének lesz-e „értelme”, és milyen „értelme” lesz, senki nem tudja előre megmondani, ami - szerencsére most már múlt időben - nagyban nehezítette a kutatások anyagi fedezetének megteremtését. A metabonomikával szembeni ellenérzések másik, jelenleg is létező forrását már említettem. Gyakran előfordul, hogy a minták klasszifikációja, csoportokhoz sorolása (pl. beteg vagy egészséges egyénektől származó) robusztusan megoldható, ám a csoportok szétválásának okai nem deríthetők fel biztonsággal, a biológiai értelmezés nem adható meg teljesen egyértelműen. Ezt a fajta bizonytalanságot a 21. században már sem az orvosok, sem a kutatók nem veszik jó néven. A már említett intelligens sebészkes a fejlesztésének jelenlegi stádiumában nagy biztonsággal különbözteti meg a beteg és az egészséges szöveteket, ám a biológiai háttér részletes elemzése még hosszabb ideig várni fog magára. Jó példája lehet ugyanakkor egy olyan „omika” elven működő eszköznek, amely gyakorlati haszna miatt ennek ellenére hamar elterjed a gyógyításban.

2.1.5. Összegzés

A metabonomika 30 éves története alatt mind az analitikai mérés technikák, mind az adatfeldolgozás látványos fejlődésen mentek keresztül. A mérőföldköveket jelentő nagyszerű újítások mellett az irodalomban azonban komoly tévedéseket tartalmazó írások is időnként napvilágot láttak. A jelek helytelen hozzárendelésére, validálás hiányában erősen túlillesztett modellekre, és élénk fantáziáról tanúskodó, ám később tévesnek bizonyuló hipotézisekre ezen a tudományterületen sem nehéz példákat hozni. A metabonomikai témában született publikációkban az ilyen tévedések száma a fejlődés során arányaiban szerencsére drasztikusan csökkent. Köszönhető ez az adatbázisokban felhalmozódó információknak, a többváltozós kemometriai módszerek ismertebbé válásának és terjedésének a tudomány szinte minden területén, valamint az olyan adatelemző szoftvereknek, melyek hatékonyan segítik a felhasználó esetleges tapasztalatlanságából fakadó hibák elkerülését. A metabonomikának, mint minden rendszerbiológiának pedig az egyik legfontosabb feladata, hogy ötleteket adjon további kutatásokhoz, így a téves hipotézisek megjelenése nem róható fel hibájaként.

Az elmúlt 30 év alatt ez a kutatási stratégiai is kinőtte a „gyerekcipőt”, és vele együtt az említett „gyerekbetegségeit” is. Talán az is elmondható, hogy mostanra elfoglalta valódi értékének megfelelő helyét a tudományban. A metabonomika igazi példája az interdiszciplináris kutatási területeknek, ezért a robosztus, valid és reprodukálható eredmények elérése elszigetelt egyéni kísérletezések helyett egyre inkább jól szervezett csapatmunkát, és a kutatók egyre szélesebb körének bevonását igényli majd.

2.2. A COMET kísérletsorozat

Ph.D. munkám jelentős részében exokrin hasnyálmirigy-gyulladást előidéző modellt toxinok hatásának szövettani és klinikai kémiai adatokon, valamint NMR spektrumokon alapuló vizsgálatát végeztem. A mérések a COMET (Consortium for Metabonomic Toxicology) kísérletsorozat részét képezték, így a következőkben ennek céljait és eredményeit foglalom össze röviden.

A XX. század második felében a gyógyszerkutatás stratégiája alapvető változásokon ment keresztül. A kombinatorikus kémia felgyorsította a vegyületek szintézisnek lépését és kiterjedt molekulabankok megszületését eredményezte, a nagy áteresztőképességű in vitro biológiai vizsgálati módszerek pedig az ígéretes gyógyszerjelölt molekulák megtalálását forradalmasították. A gyógyszerkutatás ezt követő, hatékonyságot és ártalmatlanságot vizsgáló fázisainak időigénye és költsége azonban nemhogy csökkent volna, de - részben az egyre szigorodó gyógyszerbiztonsági előírásoknak, részben az egyre „bonyolultabbá” váló terápiás célpontoknak köszönhetően - meredeken nőtt. A gyógyszerjelölt-molekulák hatékonyságát és ártalmatlanságát (vagy talán inkább toxikus voltát) indikáló biomarkerek kutatása ezért központi feladattá vált a gyógyszerfejlesztésben. Igény támadt olyan nagy áteresztőképességű módszerekre is, melyek a kedvezőtlen mellékhatás-profil szűrését már a preklinikai állatkísérletek szintjén lehetővé teszik, hogy az alkalmatlan hatóanyag-jelöltek a fejlesztés költséges folyamatából idejekorán kikerüljenek. Nem meglepő tehát, hogy az „omika” technikák fejlődését, és köztük a metabonomikát is a gyógyszeripar fogadta a legnagyobb érdeklődéssel.

A COMET (Consortium for Metabonomic Toxicology) kísérletsorozatot az Imperial College és hat gyógyszergyár, a Bristol-Myers-Squibb, az Eli Lilly and Co., a Hoffman-La Roche, a NovoNordisk, a Pfizer Incorporated és a Pharmacia Corporation összefogása hívta életre 1999-ben [75,76]. A mérések kétéves előkészítés, kísérlettervezés után 2001-ben kezdődtek és három éven át zajlottak. A konzorcium célja egy olyan, metabonomikai vizsgálatokon alapuló rendszer létrehozása volt, amely megnöveli a gyógyszergyári állatkísérletek jóslóképességét, elsősorban a várható mellékhatás-profilra vonatkozóan. Ennek eléréséhez a szokásos módon végzett állatkísérletekből nyert minták hagyományos szövettani, klinikai kémiai vizsgálatát kívánták kiegészíteni a kismolekula-összetétel átfogó jellemzésével. A rendelkezésre álló analitikai módszerek közül a korábbi toxikológiai vizsgálatok biztató eredményei és a kiváló reprodukálhatóság miatt az NMR spektroszkópiára esett a választás. A kísérletsorozat háttérében álló elv lényege az volt, hogy a szervezet folyadékterének kismolekula-összetételében bekövetkező változások bonyolult mintázata ujjlenyomatszerűen jellemzi a xenobiotikum hatására beinduló élettani és biokémiai

folyamatokat, és következtetéseket enged levonni a hatásmechanizmusra, az érintett szervekre, a károsodás mértékére és reverzibilis vagy irreverzibilis jellegére.

Ahhoz, hogy a metabonomikai vizsgálaton alapuló prediktív rendszer jól működjön, először szükség volt viszonyítási pontokra, tehát olyan mérésekre, melyek eredményeihez később hasonlítani lehet az ismeretlen toxicitás-profilú gyógyszerjelölt molekula vizsgálatával nyert eredményeket. A konzorciumi tagok a prediktív rendszer referencia pontjaiként 147 ismert, vagy ismertnek vélt toxicitású modellvegyületet választottak ki, és először ezekkel végezték el a szigorúan standardizált kísérleteket. A 147 modelltoxin nagy része máj- és vesekárosító anyag volt, hiszen gyógyszereknél ez a leggyakrabban jelentkező mellékhatás, de megtalálhatók a listán hasnyálmirigyre ható, ivarszervekre ható vegyületek és általános fiziológiás stresszorok is. (Példák: 4. táblázat, részletes lista: Lindon et al. 2005. [76]). A kísérletek megkezdése előtt sejthető volt, hogy az így létrehozott viszonyítási rendszer önmagában még meglehetősen laza lesz, de minél több saját fejlesztésű molekulát illeszt bele a későbbiek során egy gyógyszergyár, annál több vonatkoztatási pontból áll majd, és idővel annál inkább a gyógyszergyár saját igényeire szabottá válik.

Célszerv	Példák
Máj ($n=56$)	galaktózamin, klofibrát, paracetamol, klórpromazin, etionin, ANIT...
Vese ($n=33$)	gentamycin, ciszplatin, higany-klorid, 2-bromoetanamin, para-aminofenol...
Hasnyálmirigy ($n=5$)	dexametazon, sztreptozotocin, cerulein, 1-ciano-2-hidroxi-3-butén, L-arginin
Húgyhólyag ($n=1$)	ifoszfamid
Ivarszerv ($n=7$)	karbendazim, 1,3-dinitrobenzén, kadmium-klorid, di-n-pentilftalát...
Több szervre ható ($n=11$)	kloroform, azaszerin, amfotericin B, tioacetamid, kálium-dikromát...
Fiziológiás stresszor ($n=27$)	fenobarbitál, probenecid, acetazolamid, furozemid, karboplatin, metotrexát...
Validálás	Hidrazin (7 kísérlet)

4. táblázat. Példák a COMET kísérletsorozatban vizsgált modellvegyületekre.

A COMET kísérletek során mintegy körülbelül 35000 ^1H NMR spektrum készült vér- és vizeletmintákról, de a MAS-NMR technológia fejlődése időközben lehetővé tette intakt szövetek kismolekula-összetételének mérését is. A kísérletsorozatból származó, $-80\text{ }^\circ\text{C}$ -on hűtve elraktározott szövetminták vizsgálata folyamatban van, és a meglévő szérum- és vizeletspektrumok adatainak kiegészítése az azonos állattól származó szövetminták információtartalmával újabb perspektívát nyitott az adatbázis felhasználása előtt.

A COMET mérések végeztével az Imperial College kemometrikusai 80 releváns kísérlet felhasználásával CLOUDS (Classification Of Unknowns by Density Superposition) modellen alapuló máj- és vesetoxicitást jelző rendszert hoztak létre [77,78]. Emellett azonban a kísérletsorozatnak számtalan egyéb, előre nem feltétlenül várt eredménye is volt:

- A több ezer, kontroll csoporthoz tartozó állat spektruma a korábbiaknál részletesebb leírást adott a gyógyszergyári kísérletekben alkalmazott kísérleti állatok vizeletének, vérének kismolekula-összetételéről, s ezen keresztül pontosabb képet lehetett formálni az állatok élettani és biokémiai jellemzőiről, valamint az állatkísérletek extrapolálhatóságának korlátairól [79]. A nagyszámú minta segítette annak meghatározásában, hogy mi tekinthető „normálisnak”, és robusztus alapvonalat adott ahhoz, hogy a jövőben a kísérletek megkezdése előtt szűrni lehessen a kijelölt állatok körét, kizárva a deviáns, egyedi metabolikus jegyeket mutató példányokat. A kontroll csoport spektrumainak vizsgálata felhívta a figyelmet arra is, hogy anyagcseréjük szempontjából az állatok kevésbé egységesek, mint azt korábban gondolták, valamint hogy bélflóra-összetételük, és ezen keresztül vizeletük metabolit mintázata laboratóriumról laboratóriumra jelentősen változhat [80,81].

- A COMET kísérletsorozatban felépült egy több ezer kismolekula NMR jeleit tartalmazó, kémiai eltolódást, multiplicitást, intenzitásarányt és pontos jelhozzárendelést megadó adatbázis. A napjainkban interneten ingyenesen elérhető metabolit-adatbázisok jelentős részének ez képezte az alapját. (www.liu.se; www.bmrb.wisc.edu; www.hmbd.ca; stb.)

- Pontosabb ismeretek gyűltek össze a kutatómunkához régóta széles körben használt modelltoxinok hatásáról, hatásmechanizmusáról [82-86].

- A nagy körültekintéssel kidolgozott COMET kísérleti protokoll standardként szolgál a metabonomikai mérések területén, segítséget nyújtva a kutatóknak és a növekvő számú metabonomikai témájú publikáció bírálóinak a kísérlettervezési hibák elkerüléséhez, felderítéséhez [87,88].

- Néhány vizsgálat kapcsán NMR mérés technikai újításokat igénylő kérdések merültek fel [89,90].

- A leglátványosabb fejlődésen mégis a hatalmas spektrális információ feldolgozását szolgáló matematikai módszerek mentek keresztül. A 2.1.3. fejezetben vázolt fejlődési út legfontosabb mozgatórugója a COMET adatbázisban rejlő információk mind teljesebb kiaknázása volt.

- Végül, és nem utolsó sorban talán elmondható, hogy a COMET kísérletsorozat eredményei tették a metabonomikát széles körben ismert és elismert kutatási stratégiává.

A Ph.D. munkám során a 147 modelltoxin közül elsősorban a három exokrin hasnyálmirigy-gyulladást előidéző anyaggal, az L-argininnel, az 1-ciano-2-hidroxi-3-buténnel és a ceruleinnel végzett kísérleteket vizsgáltam.

2.3. Exokrin hasnyálmirigy-gyulladást előidéző modelltoxinok

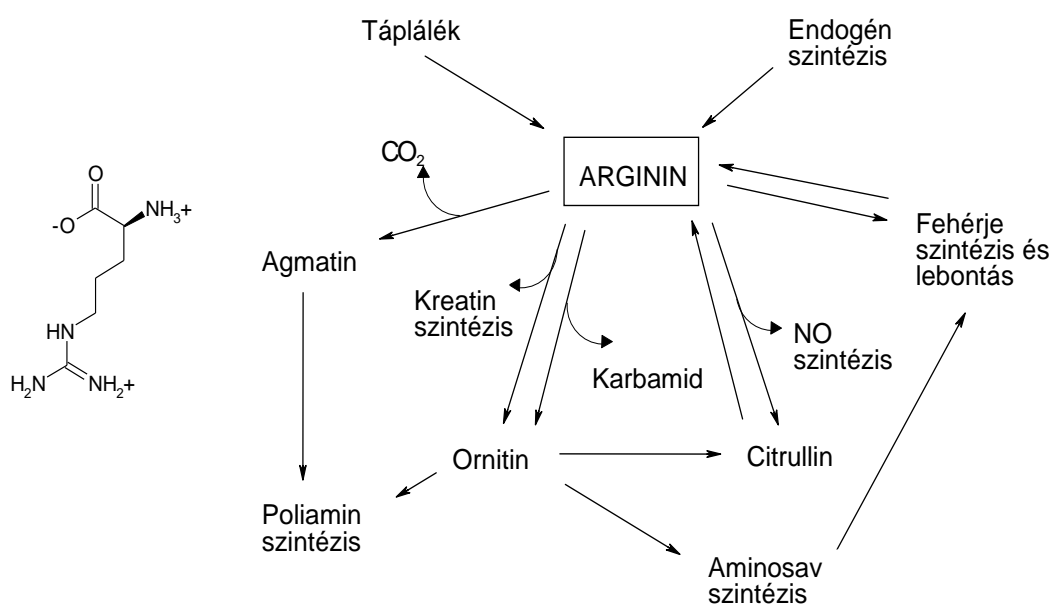
Az akut hasnyálmirigy-gyulladás patomechanizmusának, szövődményeinek és lehetséges kezelési módjainak vizsgálatához a kutatók az elmúlt évtizedekben többféle állatkísérletes modellt is kifejlesztettek [91]. Technikailag ezek invazív (sebészi úton előidézett) és nem vagy kevésbé invazív (diétán alapuló vagy injekciót igénylő) módszerekként csoportosíthatók. Az invazív állatmodellek a kórfolyamatban gyakori biliáris és vaszkuláris esetek reprodukálására és tanulmányozására szolgálnak. Kivitelezésük körülményesebb, mint a nem-invazív módszereké, hiszen sebészi beavatkozást igényelnek (zárt duodenumkacs képzése, pankreász-epe vezeték leköttése, pankreászvezeték epesavas perfúziója, vagy a hasnyálmirigy artériás/vénás keringésének akadályozása), ám humán klinikai relevanciájuk a másik csoportnál nagyobb. A nem/kevésbé invazív módszerek közül elterjedt a pankreász szekrécióját fokozó anyagok, például kolecisztoxin vagy cerulein nagy dóziséval kiváltott hasnyálmirigy-gyulladás modell, az arginin intraperitoneális injekciójával létrehozott modell, és a kolin-hiányos, etioninnal dúsított tápláláson alapuló módszer. Ezeken a

korai, sejtszintű történések és a gyógyszerjelölt-vegyületek hatásai ideálisan tanulmányozhatók, bár klinikai szempontból kevésbé értékesek. A következőkben a COMET kísérletsorozat keretében vizsgált három exokrin hasnyálmirigy-gyulladás modell jellemzőit ismertetem röviden.

2.3.1. L-argininnel előidézett exokrin hasnyálmirigy-gyulladás

Az L-arginin egy bázikus oldalláncot hordozó, szemi-esszenciális aminosav (4. ábra). Az emlős szervezet képes előállítani L-citrullinból, ám ez a szintetikus kapacitás korlátozott, és az endogén eredetű arginin csak mintegy 5-15%-át adja az összes keringő argininnek. Az aminosav fő forrása tehát a táplálék, így növekedésben lévő szervezetben és egyes betegségek esetén esszenciálissá válhat.

Az L-arginin - amellett, hogy fehérjék alkotóeleme - számos funkciót tölt be az emlős szervezetben. Ezek közül a legfontosabbakat a 4. ábra foglalja össze.



4. ábra. Az L-arginin szerkezete, forrásai és szerepe az emlős szervezetben.

Központi aminosav az urea ciklusban, így elengedhetetlen a folyamatosan termelődő toxikus ammónia eliminációjához. Szükséges a kreatin termeléséhez, mely foszforilált formájában a sejtek (elsősorban az ideg- és izomsejtek) közvetlenül mobilizálható energiaraktáraként szolgál. Prekurzora a poliaminok (putreszcin, spermidin, spermin), és az agmatin szintézisének. A nitrogén-monoxid képződésében betöltött szerepe, és ezen keresztül a vazodilatációra, trombocita-aggregációra, a fehérvérsejtek endotéliumhoz történő adhéziójának gátlására, ingerületátvitelre stb. gyakorolt esetleges hatása az utóbbi években kapott különösen sok figyelmet [92-94].

Bár az L-arginin klasszikus értelemben nem tekinthető xenobiotikumnak, intraperitoneálisan adva nagymennyiségű egyszeri dózisa már meghaladja az emlős szervezet metabolizáló kapacitását, és a kísérleti patkányokban akut exokrin hasnyálmirigy-gyulladás alakul ki. A toxikus hatás szelektív a pankreász acináris sejteire, a Langerhans-szigetek morfológiailag érintetlenek maradnak [95]. A hatás pontos mechanizmusa egyelőre nem ismert, a korábbi vizsgálatokban proteinszintézis-gátlás, lipidperoxidáció, a poliaminszint csökkenése, és a nitrogén-monoxid termelés fokozódása merültek fel lehetséges okként [96-98].

Az említett pancreatitis modellek közül az argininnel előidézett hasnyálmirigy-gyulladás nemcsak azért népszerű a kutatók körében, mert gyorsan kivitelezhető, kevésbé invazív módszer, hanem azért is, mert jól reprodukálható, a kórkép gyorsan kifejlődik, a hatás dóziszfüggő és emellett szelektív is, az egyéb szervek (máj, vese, tüdő) érintettsége minimális [91,95]. Tény azonban, hogy a kórkép kialakulása szempontjából a modell humán klinikai relevanciája csekély.

2.3.2. 1-ciano-2-hidroxi-3-buténnel előidézett exokrin hasnyálmirigy-gyulladás

Az 1-ciano-2-hidroxi-3-butén (CHB, krambén) keresztesvirágúak családjába tartozó növényekben megtalálható glikozinolátok hidrolitikus bomlásának a stabil terméke [99]. Közkeletű nevét (krambén) a crambe nemzetségről kapta, mivel korábban az anyag előállításához a *Crambe abyssinica* magját használták fel [100,101]. A '70-es években az érdeklődés azért fordult a vegyület felé, mert a keresztesvirágúakat (elsősorban repcét) nagyobb arányban tartalmazó takarmánnyal etetett különböző haszonállatoknál gyakrabban észleltek mérgezésre utaló tüneteket [102,103]. A kutatók akkor azt feltételezték, hogy az állatok szervezetében a metabolikus bontás során cianid

szabadul fel, és ez tehető felelőssé a megbetegedésekért. Mivel karfiol, káposzta, brokkoli stb. formájában keresztesvirágú növények gyakran megtalálhatók az étlapunkon, intenzívebben kezdték vizsgálni a hasonló szerkezetű vegyületek élettani hatásait [104]. A cianidok felszabadulásához köthető toxikus hatás elmélete nem igazolódott be, ellenben számos egyéb érdekes eredményt hoztak a kutatások. Nagy dózisban, orálisan adva a CHB kísérleti patkányoknál súlyos májkárosodást okoz, kisebb adagja azonban szelektív exokrin hasnyálmirigy-gyulladást idéz elő [105]. Egyszeri, 150 mg/kg szubkután adagja rövid időn belül acináris sejt apoptózist indukál a pankréaszban, melyet később szöveti nekrozis követhet [106,107]. A hatásnak a pontos mechanizmusa nem ismert, az eddigi vizsgálatok alapján kaszpázoknak és mitogén aktivált protein kinázoknak lehet kulcsszerepük a folyamatban [108,109]. További állatkísérletek azt is igazolták, hogy a krambén az apoptózis indukcióján keresztül védelmet tud nyújtani más, akut nekrotikus hasnyálmirigy gyulladást előidéző modelltoxin, pl. cerulein hatása ellen [110]. Más vizsgálatok jelentős mértékű és tartós glutation szint növekedést mértek kísérleti patkányok májában és hasnyálmirigyében a toxikusnál lényegesen alacsonyabb dózisok orális adagolása mellett. Mivel az emelkedett GSH szint növeli a szövetek karcinogénekkal és citotoxikus anyagokkal szembeni védelmét, ennek a hatásnak a vizsgálatára is irányultak kutatások [101,111].

Az 1-ciano-2-hidroxi-3-butént a COMET kísérletek modelltoxinjainak körébe elsősorban a szokatlan hatásmechanizmusa miatt választották be. A vegyületet az is érdekessé tette a kutatók számára, hogy bár egyre szaporodnak a glikozinolatokkal és származékaikkal foglalkozó tanulmányok, nagyon kevés figyelem fordítódik ezeknek az anyagoknak a farmakokinetikai tulajdonságaira [112]. Arról például, hogy a krambén milyen útvonalon metabolizálódik az emlős szervezetben, egyáltalán nem találtam információt a szakirodalomban.

2.3.3. Ceruleinnel előidézett exokrin hasnyálmirigy-gyulladás

A cerulein a kolecisztokinin szintetikus analógja, így fokozza a hasnyálmirigy emésztőenzim termelését [91]. Extrém nagy adagja kísérleti állatokban fajtól és dózistól függően enyhe ödémás vagy súlyos nekrotikus akut hasnyálmirigy-gyulladás kialakulásához vezet. A modellvegyület két okból népszerű a kutatók körében: egyrészt,

mert a szöveti elváltozások nagyon hasonlóak a humán pancreatitis korai fázisában láthatókhöz, másrészt, mert az anyag *in vitro* kísérletekhez is alkalmazható.

3. Célkitűzések

3.1. Exokrin hasnyálmirigy-gyulladást előidéző modelltoxinok

A három kísérlet elvégzésének eredeti célja egy magasabbrendű prediktív rendszer létrehozása volt, ahol ezek a mérések, akár csak a többi modellanyaggal végzett mérés, referenciapontként szolgáltak. A kísérletek részletes elemzését 2007-ben, 3 évvel a COMET együttműködés lezárása után kezdtem. A metabonomikai kutatási startégia exploratív jellegét korábban már hangsúlyoztam, és azt is, hogy tulajdonképpen felesleges előre elvárásokat és célkitűzéseket megfogalmazni egy mérésrel kapcsolatban, hiszen a legcsekélyebb garancia sincsen arra, hogy a kísérlet a céljainknak megfelelő eredményekre vezet, ugyanakkor nagy az esélye annak, hogy a várakozásoktól merőben eltérő, értékes összefüggésekre derüljön fény.

Ez a fejezet azonban kötelező eleme a disszertációnak, így az alábbiakban összegyűjtöttem néhány olyan kérdéskört, ahol ilyen típusú vizsgálatoknál az elemző válaszokat remélhet. Azokra a területekre fektettem hangsúlyt a felsorolásban, ahol korábban már a metabonomika különösen hatékony eszköznek bizonyult a válaszok megtalálásához.

- A toxin hatására a szervezetben meginduló és időben párhuzamosan zajló biokémiai és élettani folyamatok elkülönítése, azonosítása.
- A szövettani, klinikai kémiai és metabonomikai elemzés eredményeinek egységes biológiai értelmezése.
- Az anyavegyület főbb metabolikus útvonalainak feltérképezése és a metabolikus termékek szerepének vizsgálata a toxicitásban.
- Hatásmechanizmushoz köthető információk és biomarkerek keresése.
- A kísérleti állatok válaszadásában tapasztalható különbségek, esetleges rezisztencia és túlérzékenység okainak felderítése.
- Az adott állatkísérletes modell előnyeinek/hátrányainak leírása, az extrapolálhatóság korlátainak vizsgálata.

3.2. Klaszterelemzésen alapuló módszer (CLASSY) fejlesztése metabonomikai adatok feldolgozására és az eredmények megjelenítésére

A metabonomikai elemzések legfontosabb metódusai projekciós módszerek, melyek látens változók keresésén és az egyes kismolekulák modellbeli súlyának meghatározásán alapulnak. Számtalan előnyük mellett általánosságban elmondható, hogy nem ideálisak olyan kísérletek elemzésére, ahol a csoportok elkülönülése nem tökéletes (részben átfedett), vagy az állatok biológiai válasza nem egységes, vagy egységes ugyan, de időben nem pontosan szinkronizált. A metabolit-fluktuációk időbeliségének vizsgálatára csak nehézkesen alkalmazhatók, egy átlagos COMET kísérlet értékeléséhez például legalább 57 O-PLS (Orthogonal Projections to Latent Structures ld. 4.2.1.3. fejezet) modell részletes átnézésére és kijegyzetelésére van szükség. Azt a hiányosságot, hogy a spektrális jelek közötti korrelációkat nem mutatják kielégítően, és ezért sem szerkezeti, sem biológiai kapcsolatok felderítését nem segítik, a STOCSY (Statisztikai Totál Korrelációs Spektroszkópia ld. 4.2.1.4. fejezet) módszer pótolta, igaz, ezzel az elemzésre fordítandó idő szerényen becsülve is duplázódott. Célunk egy olyan rendszer kidolgozása volt, amely megtartja a STOCSY-kínálta korreláció és kovariancia elemzés előnyeit, ugyanakkor jól áttekinthető, összefoglaló képet ad a teljes kísérletről, segítve az eredmények értelmezését és feleslegessé téve a diszkriminancia analízist.

4. Módszerek

4.1. Kísérlettervezés, mintakezelés, mérési módszerek

A Ph.D. munkám során a COMET kísérletsorozat 147 modelltoxinja közül elsősorban a három exokrin hasnyálmirigy-gyulladást előidéző anyaggal, az L-argininnel, az 1-ciano-2-hidroxi-3-buténnel és a ceruleinnel végzett kísérleteket vizsgáltam. Ezek kísérlettervezése megfelelt az általános COMET kísérlettervezési protokollnak, így azt összevonva ismertetem a következő alfejezetben. Az egyes mérésekhez kapcsolódó további részletek a 4.1.2. fejezetben olvashatók.

4.1.1. A COMET mérésorozat kísérlettervezési protokollja

A COMET kísérleteket megelőző metabonomikai vizsgálatok és a kétéves előkészítő mérések során sikerült részletesen feltérképezni, hogy a genetikai/fajtabeli különbségek mellett a minták kismolekula-összetételében milyen egyéb, fiziológias körülmények okoznak jelentős változásokat [79]. Ezek közül a nem, az életkor, a táplálkozás és a diurnális ciklus emelendő ki. Bár a változások jól körülírható, jellegzetes mintázatot hagynak az NMR spektrumokon, a kísérleteket úgy tervezték, hogy ez a biológiai variabilitás a minimálisra csökkenjen.

Az állatokat a résztvevő gyógyszergyárak saját laboratóriumai kezelték, és az összegyűjtött minták hisztopatológiai és klinikai kémiai vizsgálatát is saját szakembereik végezték. Az adott állattól párhuzamosan vett minták másik részét az Imperial College-ba küldték, ahol az NMR mérések, a metabonomikai elemzés, valamint a teljes egyesített adatbázis értékelése zajlott, beleértve a gyógyszergyáraktól érkező mérési eredményeket is.

Az alkalmazott modelltoxinok dózisát a résztvevők saját kísérletes eredményeik és irodalmi adatok alapján határozták meg. A nagy dózissal kezelt állatok jellemzően komoly klinikai tüneteket és szövettani elváltozásokat okozó, éppen szubletális toxinadagot kaptak, míg a kis dózis enyhe klinikai tüneteket eredményező vagy éppen szubtoxikus mennyiség volt. A kontroll állatokat tisztán vivőanyaggal kezelték.

4.1.1.1. Mintagyűjtés

30 darab 6-8 hetes hímnemű Sprague-Dawley patkányt különítettek el egyéni metabolikus ketrecekbe, akklimatizálódás céljából már 24 órával a kísérlet megkezdése előtt. Az állatokat véletlenszerűen kontroll (C, $n=10$), kis dózissal kezelendő (LD, $n=10$) és nagy dózissal kezelendő (HD, $n=10$) csoportokba osztották. A patkányok a kísérlet ideje alatt teljes értékű standard Purina tápot kaptak, és szabad hozzáférésük volt mind a táplálékhoz, mind a vízhez. A ketrecek naponta fertőtlenítették. Minden dóziscsoportban az állatok egyik felét 48 órával, a másik felét 168 órával a vizsgált modelltoxin beadása után elaltatták. Ekkor megmérték a testsúlyukat, agyuk súlyát és a vizsgálni kívánt szervek (máj, vese, egyéb) súlyát, feljegyezték a szerveken szabad szemmel is látható makroszkopikus elváltozásokat, és szövetmintákat vettek hisztológiai és MAS-NMR vizsgálatokhoz. A vizeletet frakciónként gyűjtötték hűtött mintagyűjtő edénybe, mely bakteriosztatikumként 1 ml 1%-os nátrium-azid oldatot tartalmazott. A mintagyűjtés időpontjai: a toxin beadása előtt 16 órával, a beadáskor (0 h), majd utána 8, 24, 48, 72, 96, 120, 144 és 168 órával. (A 8 h vizeletminta tehát a beadás utáni első 8 órában gyűjtött vizelet teljes mennyisége, a 24 h minta a 8. órától a 24. óráig gyűjtött vizelet teljes mennyisége, stb.). A szérumot farokvénából származó vérből állították elő a minta levételét követő fél órán belül. A mintagyűjtés időpontjai: a toxin beadása után 24 órával és az állatok elaltatásakor. A vizelet- és szérummintákat a vizsgálatokig -40 , a szövetmintákat -80 °C-on tárolták.

4.1.1.2. Szövettani és klinikai kémiai vizsgálatok

A szövetmintákat 10% formalinnal történő fixálás után paraffinba ágyzták, a metszeteket hematoxilinnal és eozinnal festették. A normálshoz képest megfigyelhető elváltozásokról a patológus listát készített, az elváltozás mértékét pedig az egyes mintáknál az alábbi skála szerint pontozta: 0=nincs elváltozás, 1=minimális, 2=enyhe, 3=közepes mértékű, 4=jelentős mértékű, 5=súlyos.

A vizeletminták klinikai kémiai vizsgálata során mérték a minta térfogatát, ozmolalitását, pH-ját, fehérje- és glükózkoncentrációját. A szérummintáknál meghatározták a kreatinin, urea nitrogén, alanin-aminotranszferáz (ALT), aszpartát-

aminotranszferáz (AST), alkalikus foszfatáz (ALP), glükóz, nátrium, kálium, kalcium, foszfor, albumin, teljes fehérje és teljes bilirubin szintet.

4.1.1.3. ^1H NMR spektroszkópia

A méréseket 600 MHz-es készüléken egységesen 300 K hőmérsékleten végezték, megfelelő időt hagyva a minta hőmérsékletének stabilizálódására is. Átfolyó cellás rendszer, vagy hagyományos standard 5 mm-es NMR csövek (és célszerűen automata mintaváltó) egyaránt alkalmazhatók. A mérésorozat előtt egy reprezentatív minta segítségével elvégezték a mérőfej hangolását, a 90° -os pulzus hosszának meghatározását és optimalizálták a vízjelelnyomást. A mintákról a spektrumokat randomizált sorrendben vették fel, és minőségellenőrzés céljából minden ötvenedik mérés után „üres” mérést végeztek egy alkalmas standarddal.

4.1.1.3.1. Vizeletminták

400 μl mintához 200 μl nátrium-foszfát puffert adtak ($\text{pH}=7,4$), hogy a kismolekulák jeleinek pH különbségekből adódó kémiai eltolódás változása a minimálisra csökkenjen. A puffer tartalmazott továbbá 1 mM nátrium-trimetilszilil-[2,2,3,3- $^2\text{H}_4$]-propionátot (TSP) referencia-anyag gyanánt, és 20% deuterált vizet a mágneses és rádiófrekvenciás tér stabil összhangjának biztosítására („lock”). A mintákat az esetleges szilárd szennyeződések eltávolításához centrifugálták (1800 g, 5 perc). Az ^1H NMR spektrumok felvételének pulzusszekvenciája („NOESY-PRESAT”): $rd - 90^\circ - 3 \mu\text{s} - 90^\circ - 100 \text{ ms} - 90^\circ - \text{acq}$, a vízjel besugárzása a 2 s relaxációs késleltetés (rd) és a 100 ms „keverési idő” alatt történt. További mérési paraméterek: spektrális ablak 20 ppm; adatpontok száma 32k; tranziensek száma 64; apodizáció exponenciális súlyfüggvény $\text{lb}=1 \text{ Hz}$. Fourier-transzformálás után a spektrumok alapvonalát és fázisát szükség esetén korrigálták, valamint a kémiai eltolódás skálát a TSP metil jelére ($\delta=0 \text{ ppm}$) kalibrálták.

4.1.1.3.2. Szérumminták

Felolvasztás, keverés és 10 perc állás után a felülúszóból 200 μl -t 400 μl 20% D_2O -t tartalmazó fiziológiás sóoldathoz adtak, majd 10 perces centrifugálás után 500 μl felülúszót elkülönítettek a méréshez. Az ^1H NMR spektrumok felvételénél a mintákban

maradó proteinek és lipidek széles jeleinek eliminálásához a Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) spin-echo pulzusszekvenciát használták: $rd - 90^\circ - (t - 180^\circ - t)_n - acq$, ahol $rd=2$ s $n=80$ és $t=400$ μ s, a vízjel besugárzása a relaxációs késleltetés (rd) alatt történt. További mérési paraméterek: spektrális ablak 20 ppm; adatpontok száma 32k; tranziensek száma 128; apodizáció exponenciális súlyfüggvény $lb=1$ Hz. Fourier-transzformálás után a spektrumok alapvonalát és fázisát szükség esetén korrigálták, valamint a kémiai eltolódás skálát az α -D-glükóz anomer protonjának jelére ($\delta=5,23$ ppm) kalibrálták. (TSP használata kerülendő, mivel kötődik a fehérjékhez.)

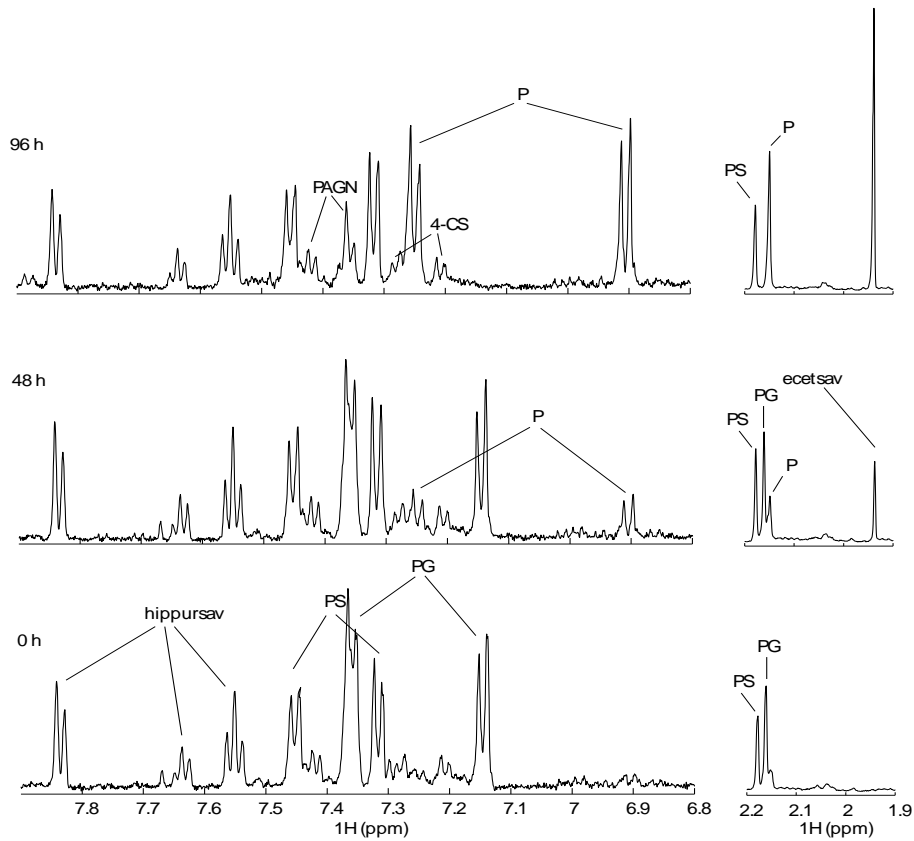
4.1.1.4. Megjegyzések a kísérlettervezési protokollhoz

A metabonomikai vizsgálatoknál a mintaelőkészítési és a mérési protokoll tág határok között változtatható anélkül, hogy az adott kísérletből levonható következtetések veszítenének érvényességükből [113]. A kutatók tehát szabad kezet kapnak a kísérlettervezésben mindaddig, amíg a részletek publikálásával egyértelművé teszik mérésük validitását. Célszerűnek tűnt ugyanakkor egységes metódust kialakítani a metabonomikai vizsgálatokhoz, elsősorban azért, hogy a különböző kutatócsoportok által végzett mérések összevethetőek és együttesen is elemezhetőek legyenek, illetve hogy az adatbázisokban felhalmozódó információ mindenki számára közvetlenül felhasználhatóvá váljon. 2003-ban alakult meg egyetemi, gyógyszerügyi és hatósági szakértők részvételével a Standard Metabolic Reporting Structures (SMRS) munkacsoport [87], 2005-ben pedig a Metabolomics Standard Initiatives (MSI) csoport [114]. Ajánlásaikat ma már minden metabonomikai mérésnél szem előtt tartják, ebben a fejezetben csak egyetlen momentumra szeretnék részletesebben kitérni.

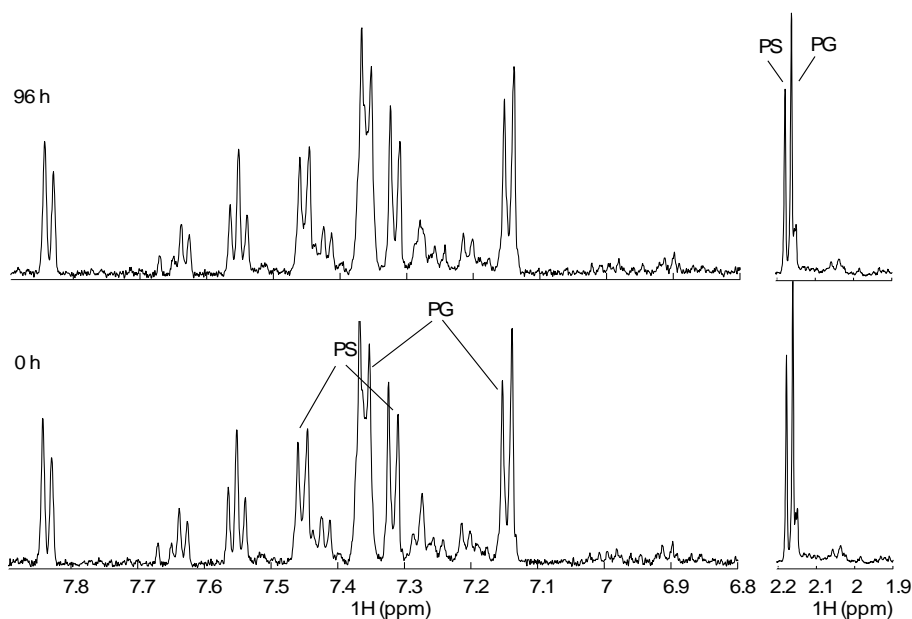
A vizeletminták nátrium-aziddal történő kezelése rutinszerű a metabonomikai vizsgálatokban, sajnos azonban egyáltalán nem része a klinikai gyakorlatnak. Andódy Kata gyógyszerésszel végzett méréseink szerint egyes egészséges önkéntesek vizeletmintáinál előfordulhat, hogy szobahőmérsékleten tartva, megfelelő inkubációs idő után a minták kismolekula-összetétele megváltozik. A folyamat egyik legjobb indikátorának a paracetamol-metabolitok bizonyultak. Több párhuzamos kísérletben a mintavételt követő első 24 órában még az irodalomban leírt, normális paracetamol-metabolit arányokat mutatták a vizeletminták, azonban az ezt követő mérési időpontokban a paracetamol-glükuronid mennyisége fokozatosan csökkenni kezdett, a

konjugátlan paracetamol mennyisége pedig növekedett (5. ábra). A 72. órára a spektrumokból teljesen eltűntek a paracetamol-glükuronid jelek, és maximális koncentrációt ért el a metabolizálatlan paracetamol. Mindemellett megnövekedett az ecetsav jele is, és a minták trimetilamin-*N*-oxid tartalma trimetilaminná alakult. Amennyiben a vizeletet a gyűjtéskor Na-aziddal kezeltük, sem a fenti, sem más változásokat nem lehetett látni a spektrumokon a kísérlet teljes, 120 órás időtartamában (5. ábra).

A)



B)



5. ábra. Egészséges önkéntestől származó vizeletminta 500 mg paracetamol bevitelét követően. A) A minta azon felének 600 MHz ^1H NMR spektrumai különböző időpontokban, mely nem tartalmazott nátrium-azidot. B) A minta azon felének 600 MHz ^1H NMR spektrumai, mely tartalmazott nátrium-azidot. Jelmagyarázat: P, paracetamol; PG, paracetamol-glükuronid; PS, paracetamol-szulfát; PAGN, fenil-acetil-glutamin; 4-CS, 4-krezol-szulfát.

A bakteriális enzimaktivitást gátló anyag használata ezek alapján valóban indokoltnak tűnik, és ha felmerül annak a lehetősége, hogy egyszer egy kísérlet eredményeit metabonomikai vizsgálatokkal is kiegészítik, a klinikumban a mintagyűjtéskor erre már gondolni kell. Amikor az Egyesült Királyság biobank-rendszerének mintakezelési protokollját összeállították, a nátrium-azid használatát toxikus volta miatt biztonsági okokból elvetették [115]. Kis mintaszámú pilótakísérletünk mellett a 6.1.1. fejezetben egy nagyobb lélegzetű humán klinikai vizsgálat kapcsán is kénytelen vagyok szomorú példát mutatni arra, hogy bakteriális enzimaktivitást gátló anyag hiányában az összegyűjtött minták alkalmatlannak minősülhetnek későbbi metabonomikai vizsgálatokra.

4.1.2. Az egyes kísérletek kísérlettervezésének további részletei

4.1.2.1. L-argininnel előidézett exokrin hasnyálmirigy-gyulladás

A kísérlettervezés megfelelt a COMET kísérleti protokollnak (ld. 4.1.1 fejezet).

Valamennyi állat egyszeri 10 ml/kg intraperitoneális injekciót kapott. Az injekció a nagy dózissal kezelt csoport (HD) esetén fiziológiás sóoldatban oldva 4000 mg/kg L-arginin-hidrokloridot tartalmazott, a kis dózissal kezelt csoportnál (LD) 1000 mg/kg L-arginin-hidrokloridot alkalmaztak, míg a kontroll állatok tisztán fiziológiás sóoldatot kaptak.

A nagy dózissal kezelt (HD) csoport 10 állat helyett ebben a kísérletben 20-ból állt. A nagyobb számú kísérleti állat bevonását az indokolta, hogy a szakirodalom az alkalmazott magas dózisonál 10% fölötti halálozási arányról számolt be.

A kísérlet során morfológiai és szövettani szempontból a máj és a vese mellett a hasnyálmirigyet vizsgálták. A szérum amiláz szint meghatározása rutinszerű a pancreatitis diagnosztikájában, így a klinikai kémiai mérések erre is kiterjedtek. Az ^1H NMR spektrumokat automata átfolyócellás rendszerrel Bruker DRX 600 Mz-es készüléken vették fel.

4.1.2.2. 1-ciano-2-hidroxi-3-buténnel előidézett exokrin hasnyálmirigy-gyulladás

A kísérlettervezés megfelelt a COMET kísérleti protokollnak (ld. 4.1.1 fejezet)

A kísérlet során morfológiai és szövettani szempontból a máj és a vese mellett a hasnyálmirigyet vizsgálták. A klinikai kémiai mérések a szérum amiláz szint meghatározására is kiterjedtek.

Valamennyi állat egyszeri 10 ml/kg szubkután injekciót kapott. Az injekció a nagy dózissal kezelt csoport (HD $n=10$) esetén fiziológiás sóoldatban oldva 150 mg/kg CHB-t tartalmazott. A kis dózissal kezelt csoportot (LD $n=10$) fiziológiás sóoldatban oldott 15 mg/kg krabénnel kezelték, míg a kontrollállatok tisztán fiziológiás sóoldatot kaptak.

Az ^1H NMR spektrumokat automata átfolyócellás rendszerrel Bruker DRX 600 Mz-es készüléken vették fel. A toxin-metabolitok szerkezetének ellenőrzéséhez kétdimenziós NMR spektrumokat (HSQC, HMBC, COSY, TOCSY) is készítettünk,

ehhez a HD csoportba tartozó egyik kísérleti állat 24. órától származó vizeletmintáját használtuk. A méréseket hűtött elektronikájú („krio”) mérőfejjel ellátott (Bruker Avance, TCI) 600 MHz-es készüléken végeztük.

4.1.2.3. Ceruleinnel előidézett exokrin hasnyálmirigy-gyulladás

A kísérlettervezés megfelelt a COMET kísérleti protokollnak (ld. 4.1.1 fejezet)

A kísérlet során morfológiai és szövettani szempontból a máj és a vese mellett a hasnyálmirigyet vizsgálták. A klinikai kémiai mérések a szérumban amiláz szint meghatározására is kiterjedtek. Az ^1H NMR spektrumokat automata átfolyócellás rendszerrel Bruker DRX 600 Mz-es készüléken vették fel.

A rendelkezésre álló irodalmi források alapján [116-119] a COMET kísérlet tervezésénél az állatorvos az LD csoportnak ($n=10$) egyszeri 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ intraperitoneális cerulein adását rendelte, míg a HD csoport állatait ($n=10$) egyórás intervallumokban 4-szer 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ adaggal kezelték.

4.1.2.4. Klaszteranalízisen alapuló adatelemző módszer (CLASSY)

A módszer tesztelésére és iteratív fejlesztésére, valamint az alap beállítási paraméterek optimalizálására néhány egyéb COMET kísérlet mellett elsősorban az L-arginin modelltoxinnal végzett kísérletet használtuk. Validálás céljából további hét COMET kísérlet részletes értékelését is elvégeztük.

4.2. Adatelemző módszerek

4.2.1. Exokrin hasnyálmirigy-gyulladást előidéző modelltoxinok vizsgálatához alkalmazott módszerek

A COMET kísérletek első értékelésekor szükség volt adatredukcióra, így az NMR spektrumokat az elemzés előtt kb. 250 db 0,04 ppm-es szegmensre bontották. Ez jelentős mértékű információvesztést okozott azonban, ezért 2005 után, amikor a teljes spektrális terület analízise megoldhatóvá vált, a résztvevők a COMET adatbázis újbóli értékelése mellett döntöttek.

A következő alfejezetekben kizárólag azokról az elemzési módokról írtam rövid ismertetést, melyeknek ábrái a dolgozatban és a saját publikációkban szerepelnek. A módszerek matematikai részleteit a hivatkozások tartalmazzák.

4.2.1.1. Adatok előkészítése: normalizálás, a jelek kémiai eltolódásának igazítása, skálázás

A biológiai minták egy részénél, különösképpen a vizeletnél, az oldott kismolekulák koncentrációja a vízfelvételtől, vizeletürítés gyakoriságától függően már fiziológiásan is széles határok között változhat. Az endogén kismolekula-összetétel elemzésének első lépésében az ilyen mintákat összehasonlíthatóvá kell tenni, azaz normalizálni kell, hiszen a kérdés itt nem az, hogy mennyi található a mintában az adott metabolitból, hanem hogy annak aránya hogyan viszonyul a többi kismolekulához, azaz mennyi a vizsgált metabolit relatív koncentrációja. Az első metabonomikai mérések a klinikai kémiai gyakorlat alapján a kreatinin jel területére történő normalizálást használták. Ennek egyrészt technikai nehézségei vannak (kreatinin jelek átfedettsége, kémiai eltolódás pH függése), másrészt pontatlan eredményre vezethet, hiszen a kreatinin szint változása gyakran része a toxinra adott válasznak, tehát nem pusztán a vizelet koncentrátságának indikátora, hanem önálló marker. Helyette ezért a teljes spektrális területre történő normalizálás terjedt el, ahol egy adott spektrum hígítási faktora az a szorzószám, amellyel a teljes görbe alatti területet megszorozva a generált standard spektrum görbe alatti területét kapjuk. A módszer a kísérletek jelentős részében elfogadható eredményre vezet, bár azok a spektrumok, ahol egy sok jelet adó endogén kismolekula, például glükóz relatív koncentrációja változik meg jelentősen, normalizálhatatlanok maradnak. Toxikológiai méréseknél nehézséget okozhat továbbá azoknak a spektrumoknak a kezelése, melyek az anyavegyület és metabolitjainak jeleit is tartalmazzák (jellemzően LD csoport 8 h, HD csoport 8 h és 24 h), hiszen ezeknél a teljes görbe alatti terület megint csak nem hasonlítható össze a kísérlet standard (reprezentatív) spektrumának görbe alatti területével. A hibát, némi adatvesztés árán, úgy lehet orvosolni, hogy a DRC jelekhez tartozó ppm tartományokat az elemző a normalizálás előtt az összes spektrumból kivágja. A teljes területre történő normalizálásnál robusztusabbnak, és szélesebb körben alkalmazhatónak bizonyult Frank Dieterle 2006-ban javasolt PQN („Probabilistic Quotient Normalization”) módszere

[120]. Ez a megoldás abból a feltételezésből indul ki, hogy a metabonomikai méréseknél sok jel intenzitása változik ugyan, de a legtöbb jel intenzitása a biológiai válasz során mégiscsak érintetlen marad és tisztán a hígítási faktor függvénye. Egy adott spektrum esetében tehát azt a szorzószámot kell megtalálni, amellyel a legtöbb jel intenzitása ráigazítható a standard spektruméra, mert ez a legvalószínűbb valódi hígítási faktor. Az első lépésben a spektrum adatpontjaihoz tartozó szorzószámokat kell egyenként meghatározni és fel kell venni ezeknek az értékeknek a spektrumra jellemző eloszlási görbéjét. A valódi hígítási faktor legvalószínűbb értéke az eloszlási görbe módusza, mellyel ezek után a spektrum összes adatpontját meg kell szorozni. A lépések teljesen automatizálhatók, és a kísérlet összes spektruma ezzel a módszerrel másodpercek alatt normalizálható, bár, mivel az eloszlási görbék önmagukban is értékes információt szolgáltathatnak, érdemes rájuk is vetni egy pillantást. A PQN módszerrel normalizált kísérletek többségénél nem szükséges kivágni a DRC-k jeleit a spektrumokból, és azok relatív koncentrációjából félkvantitatív becsléseket lehet tenni a különböző dóziscsoportok által ürített metabolitok arányára. A módszer, bár vannak korlátai, több lehetőséget ad az elemzőnek a normalizálás optimalizálására (pl. szükség esetén a módusz helyett választható másik érték az eloszlási görbéről), és sok korábban normalizálhatatlannak tűnő kísérletnél vezetett elfogadható eredményre. Ma ez a legszélesebb körben alkalmazott normalizálási technika.

Az ^1H NMR spektrum jeleinek kémiai eltolódását az oldószer, annak pH-ja, ionerőssége, fémion-tartalma, a vizsgált anyag komplexképző hajlama stb. is befolyásolják. Különösen jól látható ez a vizeletminták esetében. Bár a minta előkészítésének fontos része a puffer hozzáadása, ez csak részben orvosolja a problémát, különösen például, ha a kezelt állatok vizeletének pH-ja a kísérletben a toxin hatására jelentősen megváltozott. A COMET mérések idejében a jelek néhány század ppm-es „csúszkálása” nem volt kritikus nehézség, mivel a 0,04 ppm széles szegmensekre bontott spektrumoknál a legtöbb jel a puffer hozzáadásának eredményeként a szegmensén belül maradt, a kismértékű kémiai eltolódás változás csak néhány kismolekula esetén okozott gondot. Később, amikor a szoftverek már a spektrumok összes adatpontját felhasználták, a jelek pontos egymásra igazítása alapvető fontosságúvá vált. A rendelkezésre álló módszerek azonban vagy megbízható eredményt nyújtottak, de nagyon időigényesek voltak, vagy gyorsak voltak ugyan, de a

kisintenzitású csúcsoknál pontatlanok [121,122]. Az Imperial College-ban dolgozó Kirill Veselkov 2009-ben jó megoldást talált arra, hogy ezt a kompromisszumot ne kelljen megkötni. RSPA („Recursive Segment-wise Peak Alignment”) módszere másfél perc alatt igazítja be 400 spektrum jeleit a teljes kémiai eltolódás tartományban, és pontossága eléri az addig használt legjobb módszerekét, a jelalak megtartása mellett [123].

A többváltozós statisztikai modellek építését megelőző utolsó lépés a spektrális adatok skálázása. Míg a normalizálás az adattábla sorvektorain végzett átalakítás volt, ez az oszlopvektorokat érinti, és lényege, hogy minden egyes változó azonos súllyal szerepeljen a kiindulási adatok halmazában. A spektrumok közvetlen vizuális értékelésének legnagyobb hátránya, hogy szemünk hamarabb észreveszi a nagy intenzitású jelek kismértékű változását, mint a kisintenzitásúak abszolút értékben kicsi, de arányaiban jelentősebb változását. Hajlamosabbak is vagyunk ezért az előbbieknek nagyobb jelentőséget tulajdonítani. Az adatok skálázása ezt küszöböli ki. A legelterjedtebb skálázási mód a statisztikai standardizálás (autoscaling), mely az adatok konstans eltolását és léptékváltását jelenti úgy, hogy a tulajdonságvektorok elemeinek számtani közepe 0, szórása pedig 1 legyen.

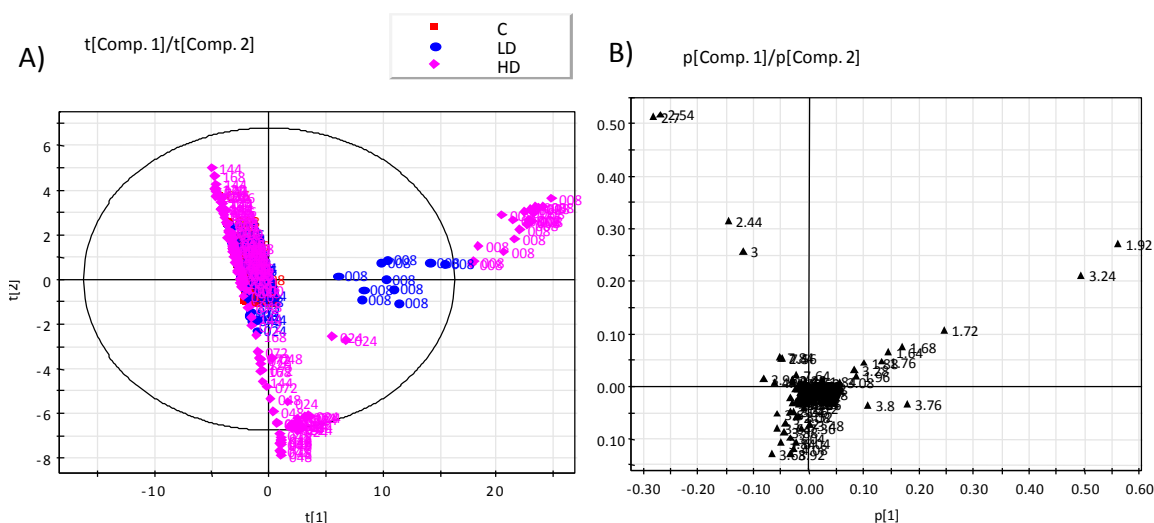
4.2.1.2. Főkomponens-analízis (PCA)

A főkomponens-analízis egy nem-irányított, projekción alapuló módszer. A háttérben álló elgondolás lényege, hogy a vizsgált rendszer viselkedését a sok változó ellenére is csak néhány látens, felsőbbrendű változó határozza meg, melyeket az egyedi változók lineáris kombinációjaként kapunk meg. Előnye a módszernek, hogy olyan adattáblákkal is jól birkózik, melyek nem négyzet alakúak (esetünkben kevés sort és sok oszlopot tartalmaznak), és ahol nagy arányban fordulhatnak elő hiányzó adatok, illetve a változók korreláltak lehetnek.

Az állatok mintáinak spektrumai (objektumok, „sorok”) pontként ábrázolhatók egy olyan térben, melynek annyi dimenziója van, ahány változó („oszlop”) az adattáblában. Az oszlopok jelintenzitás értékeket és ezen keresztül metabolit koncentrációt tükröznek. Az eredeti változók által kifeszített sokdimenziós teret a PCA analízissel egy alacsonyabb dimenziójú térbe vetítjük, úgy, hogy az első főkomponens azt az irányt mutatja, amelybe az eredeti objektumfelhőben a legnagyobb volt a pontok

kiterjedése, a második (merőleges, tehát az előbbtől független) főkomponens pedig amelyben a második legnagyobb, és így tovább. Az egymást követő főkomponensek tehát ortogonálisak, és rendre egyre csökkenő arányban magyarázzák az adathalmazban található változékonyságot, míg végül csak a zaj marad. A főkomponens ábrán az objektumok közötti távolságok az eltérések mértékére és irányára utalnak, a csoportokba rendeződő pontoknál pedig biztosak lehetünk abban, hogy azok a minták fontos tulajdonságok szempontjából hasonlítanak egymásra. A főkomponens ábrával tökéletes átfedésben megjeleníthető a főkomponens-együtthatók ábrája, mely a változók (oszlopok) közötti kapcsolatot mutatja meg, és azt, hogy milyen súllyal szerepelnek az egyes változók a modellben, mekkora részben járulnak tehát hozzá a főkomponensek kijelöléséhez. A két ábra együttes elemzése megadja, hogy milyen kisebb csoportokra bontható a mintahalmaz, és a csoportokba rendeződésért mely metabolitok koncentrációváltozása felelős (6. ábra). Ha utólag a dóziscsoportjuknak megfelelően megszínezzük a pontjainkat, akkor meghatározható, hogy mely főkomponens(ek) mentén, mely változók következtében különülnek el a csoportok egymástól, bár ennek vizsgálatára a PCA-n alapuló SIMCA (Soft Independent Modelling of Class Analogy) analízis alkalmasabb [124].

PCA segítségével a kívülálló spektrumok is jól szűrhetők a mintahalmazból. A metabonomikai adatok gyűjtése egyszerűnek nem nevezhető analitikai módszeren alapul, így mérési hibák, hibás spektrumok előfordulhatnak. Ezek jellemzően erős kívülállóként jelentkeznek a főkomponens ábrán, melyet a Hotelling T^2 próbával kijelölt területen kívüli helyzetük mutat. Mivel ezek a spektrumok lényegében „maguk felé húzzák” a főkomponenseket, a modelltől kizárandók. Óvatosabban kell ugyanakkor eljárni a reziduumok elemzésével talált mérsékelt kívülállók esetében, ezek kizárására csak akkor kerülhet sor, ha az elemző megnyugtató magyarázatot talál egyedi viselkedésükre.



6. ábra. Példa metabonomikai adatok főkomponens-analízisére. A) Főkomponens ábra. Az objektumok a vizsgált minták dóziscsoport szerint színezve. A mellettük lévő számok a mintagyűjtés időpontját jelzik. B) Főkomponens-együttható ábra. A számok a vektorokhoz tartozó kémiai eltolódás értéket mutatják. Modelltoxin: L-arginin. A kiindulási spektrumok normalizáltak, 0,04 ppm széles szegmensekre bontottak, és tartalmazzák a DRC jeleket. Az A) ábrán látszik, hogy az első főkomponens mentén az LD 8 h, a HD 8 h és néhány HD 24 h minta válik el a többitől. A különválás oka a B) ábráról olvasható le: a megadott irányban a DRC metabolitok kémiai eltolódás értékei találhatók. A második főkomponens mentén a minták nagy része egy széthúzó sávot alkot. A B) ábra szerint ezt citrátkör-intermedierek koncentrációváltozása okozza. Levonható következtetések: A további eleméshez a DRC jeleket célszerű kivágni. A citrátkör-intermedierek koncentrációváltozásának van jelentősége a kísérletben, de súlyuk a statisztikai modellben valószínűleg eltúlzott és torzulást okoz.

4.2.1.3. PLS (Projections to Latent Structures) és továbbfejlesztése

A főkomponens-analízishez hasonlóan a PLS módszer is az eredeti változók lineáris kombinációjaként kapott ortogonális látens változók keresésén alapul, a keresést azonban egy Y (függő változó) vektor esetleg mátrix, és az azzal való korreláltság irányítja. A PLS rendelkezik ugyanazokkal a jó tulajdonságokkal, mint a PCA (megengedhető sok változó és kevés objektum, változók korreláltsága, hiányzó adatok), és ez alkalmassá teszi metabonomikai mérések eredményeinek értékelésére. A modellépítés során a függő és a független változók azon látens változóit keressük, melyek között a korreláció a lehető legnagyobb [125].

Az Y vektor felvehet diszkrét, csoporthoz tartozást mutató értékeket, így a módszer alkalmas diszkriminancia analízisre (PLS-DA). Ha arra a kérdésre keressük a választ, hogy mely spektrális adatok milyen mértékű és irányú változása mekkora

súllyal felelős a kísérletben a csoportok szétválásáért, akkor a PLS együtthatókat célszerű vizsgálni a változó (itt kémiai eltolódás) függvényében, a súlyt pedig színskála segítségével megjeleníteni. Olivier Cloarec javaslatára NMR spektrumokon alapuló elemzésekor szokás az együtthatókat visszaszorozni a változó eredeti szórásával, mert így az ábrán egy ál-NMR spektrum rajzolódik ki [126]. Ez nagyban segíti az elemzőt a kismolekula gyors azonosításában, hiszen lényegesen szemléletesebb, és a kémiai eltolódás értékek mellett tükrözi a jelek eredeti alakját, multiplicitását is. A csoportok közötti eltérésekért felelős kismolekulák „jelei” tehát az ábrán piros színnel rajzolódnak ki, és a jelek iránya megmutatja, hogy a kezelt állatok mintáiban az adott metabolit relatív koncentrációja nőtt vagy csökkent pl. a kontrollhoz képest (példa: 9. ábra).

A PLS modelleket sajnos jelentősen torzítják azok a változók, melyek szórása a mintán belül nagy, de független az Y vektortól. A problémát az úgynevezett O-PLS (ortogonális PLS) módszerrel lehetett orvosolni, mely egy OSC (orthogonal signal correction) szűrő segítségével képes szétválasztani az Y-tól lineárisan függő és attól független szisztematikus változásokat, csak az előbbieket használva a modellépítéshez [24,127,128]. A kapott modellek jóslóképesége megmarad, és értelmezhetőségük jelentősen javul, a nem-korreláló szisztematikus változások pedig külön is elemezhetőkké válnak [126].

Az PLS modellek túligazítottságának elkerüléséhez hétszegmensű keresztvalidálást szokás alkalmazni, mely hét rekurzív lépésben az adatok egy hetedének kihagyását és az így generált modellbe történő visszajóslását jelenti [129]. A jóslóképeséget a prediktált és a valós értékek négyzetes eltérése alapján kalkulált Q^2 érték jellemzi. Az illeszkedés jóságát tükröző R^2 és a jóslóképeségre utaló Q^2 értéke együttesen mutatja a modell megbízhatóságát.

4.2.1.4. Statisztikai Totál Korrelációs Spektroszkópia (STOCSY)

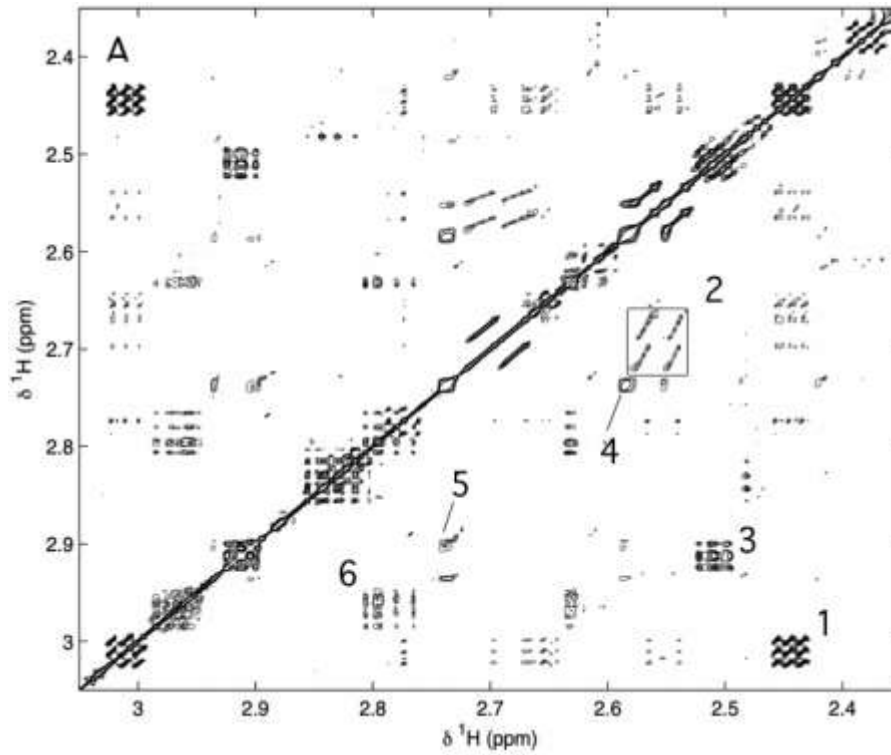
A módszer a kísérlet során gyűjtött spektrumok jeleinek intenzitásváltozásai közötti összefüggéseket vizsgálja, és szűri a mintáról mintára konzisztensen együtt, egy irányba és azonos mértékben változó jeleket [26,130]. Alkalmazásakor tehát robusztus eredmény minél nagyobb számú spektrum felvételével és értékelésével biztosítható. A spektrális csúcsok korreláltsága alapvetően két okra vezethető vissza: A jelek vagy egy és ugyanazon kismolekula jelei, és így intenzitásarányuk értelemszerűen minden

spektrumon azonos, vagy olyan egymástól különböző kismolekuláktól származnak, melyeknek a szerkezetbeli sorsa hasonló, metabolikus útvonaluk összekapcsolódik, és ezért a kísérlet során a mintákban a koncentrációjuk nem független egymástól [26]. Az előbbi esetben, szerkezeti összetartozásnál a korrelációs koefficiens elméleti értéke 1, a gyakorlatban azonban a spektrum zajossága és a jelek átfedettsége miatt ennél alacsonyabb lehet, és általában 0,80 - 0,97 értéket vesz fel. A biokémiai kapcsolat szorosságának vizsgálatánál $r^2=0,65$ már elgondolkodtató szám, és olyan toxin- vagy gyógyszer-metabolitok esetén is ritkán kapunk 0,85-nél magasabb értéket, melyek átalakulási útvonala csak az utolsó lépésben válik szét. A korrelációs koefficiens értéke tehát segít a ko-linearitás eredetének megállapításában, a szerkezeti és biokémiai kapcsolat szétválasztásában. A STOCSY eredménye megjeleníthető mind egy-, mind kétdimenziós formában.

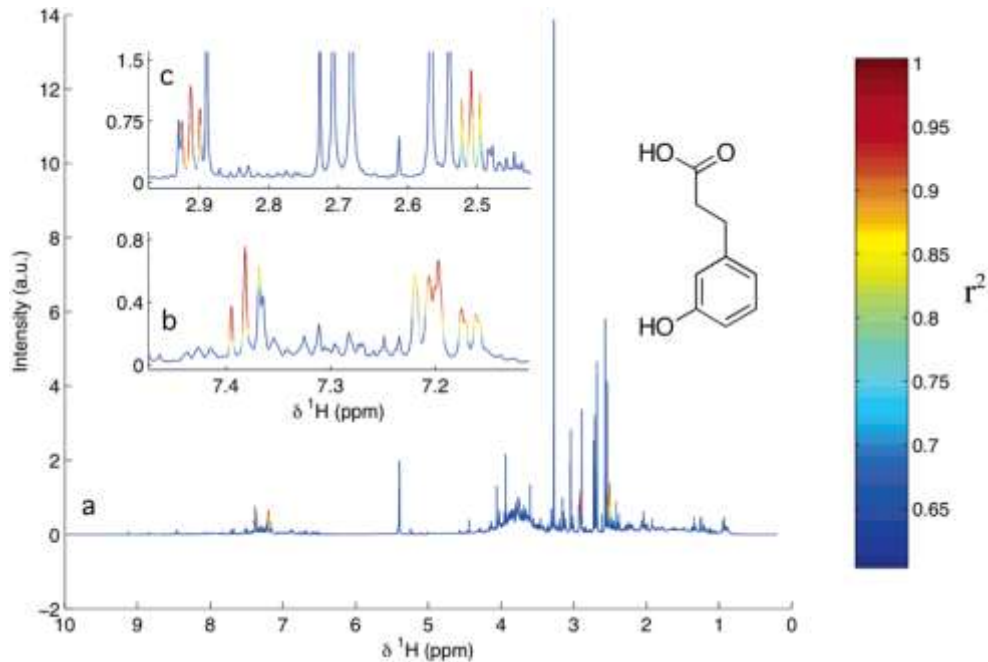
A kétdimenziós ábra a hagyományos 2D TOCSY spektrumokra emlékeztet, mindkét tengelyén a kémiai eltolódás skála olvasható (7. ábra, A). A felbontás kellően nagy ahhoz, hogy a keresztcsúcsok tükrözzék a jelek multiplicitását és a csatolási állandók is leolvashatóak legyenek (7. ábra A, 2-oxoglutársav és 3-HPPA jelei). Ha a jelek pH, ionerősség stb. következtében fellépő kémiai eltolódás változását előzetesen nem korrigáltuk, akkor a diagonálison és a keresztcsúcsokon pont helyett vonal van a jelek helyén (7. ábra A, citromsav jelei). A keresztcsúcsok a csatolási állandó pH-függését is tükrözik, mert ilyenkor a vonalak nem párhuzamosak a főátlóval (7. ábra A, citromsav jelei). Különbség a TOCSY spektrumhoz képest, hogy itt a biokémiai okokból korrelált metabolitok jelei között is kialakulnak keresztcsúcsok (7. ábra A, metilamin, dimetilamin és trimetilamin keresztcsúcsok).

Az egydimenziós ábra elkészítéséhez az elemzőnek ki kell választania azt a csúcsot („driver peak”), amelynek a többi jelhez fűződő kapcsolata érdekli őt. Az elemzés eredményeként kapott ábrán (mely egyébként célszerűen annak a mintának a spektruma, amelyben a csúcs intenzitása maximális volt) színskála mutatja a kérdéses csúcs és a többi jel közötti korreláció mértékét, így pirossal kiemelkedik annak a kismolekulának az ^1H NMR spektruma, amelyhez a csúcs tartozik (7. ábra, B).

A)



B)



7. ábra. Statisztikai Totál Korrelációs Spektroszkópia (STOCSY) ábrák vizeletminták esetében. A) Kétdimenziós ábra részlete. Jelmagyarázat: (1) 2-oxoglutársav; (2) citromsav; (3) 3-hidroxi-fenil-propionsav; (4) metilamin és dimetilamin keresztcsúcsa; (5) dimetilamin és trimetilamin keresztcsúcsa. B) Egydimenziós ábra és részletei. Kiindulási csúcs: $\delta=2,51$ ppm jel, mely a 3-hidroxi-fenil-propionsav többi jelével korrelál magasan. Ábra: Olivier Cloarec.

A jelek közötti kapcsolat felfedezésének az sem szab korlátot, ha heteroatom vagy kvaterner szénatom választja el a $(\text{CH})_n$ csoportokat a szerkezetben. Az, hogy mennyi információ nyerhető a kémiai eltolódásokról, jelfelhasadási mintázatról, csatolási állandóról és intenzitásarányokról, a jelek átfedtségének mértékétől függ, de az egydimenziós ábrák értékelése az esetek nagy részében már elegendő ahhoz, hogy az adatbázisok átnézése után az elemzőnek alapos gyanúja legyen a kismolekula mibenlétére. Az egydimenziós ábrák gyorsabban elkészülnek, mint a kétdimenziósak, és könnyebben áttekinthetőek, hiszen az ismert, „triviális” kapcsolatok jeleitől mentesek. Az 1D STOCSY-t O-PLS módszerrel kombinálva az ábrákon egyértelműen látszik a kapcsolat iránya (korrelált vagy anti-korrelált), így biokémiai háttér elemzéséhez ennek a használata a célszerűbb (példa: 18. ábra).

Összefoglalásképpen hadd emeljem ki még egyszer a STOCSY, mint elemzési módszer néhány vonatkozását, egyúttal válaszolva a metabonomikai publikációk bírálói által oly gyakran feltett kérdésre is: Mi az előnye a STOCSY-nak az NMR-TOCSY mérésekhez képest?

- Az egydimenziós NMR spektrumok felvétele után már nem kell hozzá NMR készülék, csak egy számítógép.
- Nem okoz nehézséget a második dimenzió alacsony felbontása.
- Az ábra hosszas mérésidő helyett másodpercek alatt elkészül.
- A jelek közötti kapcsolati lánc nem szakad meg, ha a szerkezetben kvaterner szén, vagy heteroatom választja el a spinrendszereket.
- A szerkezeti összetartozás mellett a biokémiai kapcsolat is megjelenik az ábrán, és a korrelációs koeficiens értéke alapján a szerkezeti összetartozástól általában jól elkülöníthető.

4.2.2. Az egyes kísérletek adatelemzésének további részletei

4.2.2.1. L-argininnel előidézett exokrin hasnyálmirigy-gyulladás

Az ^1H NMR spektrumokat MATLAB (R2006b verzió) szoftverbe importáltam, és a víz ($\delta=4,7-4,9$ ppm), a TSP ($\delta=-0,2-0,2$ ppm), valamint a karbamid ($\delta=5,6-6,0$ ppm) jeléhez tartozó régiókat kivágtam. Két adatkészletet készítettem. Az elsőben az arginin jeleit kivágtam és a spektrumokat teljes területre normalizáltam, a másodikban

meghagytam az anyavegyület jeleit és a normalizálásához PQN módszert használtam. Eredményeimet mindkét adatkészleten ellenőriztem. A szérumszűrés- és vizeletminták kismolekula-összetételbeli változásainak vizsgálatához O-PLS-DA modelleket készítettem. Időpontról időpontra összehasonlítottam a kezelt állatok csoportjainak spektrumait a kontroll állatokéval, és minden dóziscsoporton belül nyomon követtem az egyes mintavételi időpontok közötti metabolit-fluktuációt is. Annak szűrésére, hogy mely eltérések voltak jellemzőek kizárólag a nagy dózissal kezelt állatokra, az LD csoportot HD csoporttal összehasonlító modelleket is készítettem minden időpontban. A jelek azonosítását STOCSY segítette. A kívülálló adatok szűrését főkomponens-analízissel is elvégeztem, melyet SIMCA-P+11.5 szoftverrel csináltam. A röppálya-elemzéshez a 0,04 ppm széles szegmensekre bontott spektrumok adatait használtam.

4.2.2.2. 1-ciano-2-hidroxi-3-buténnel előidézett exokrin hasnyálmirigy-gyulladás

Az ^1H NMR spektrumokat MATLAB (R2006b verzió) szoftverbe importáltam, és a víz ($\delta=4,7-4,9$ ppm), a TSP ($\delta=-0,2-0,2$ ppm), valamint a karbamid ($\delta=5,6-6,0$ ppm) jeléhez tartozó régiókat kivágtam. Két spektrumkészlettel dolgoztam. Az egyikben az anyavegyület és metabolitjainak jeleit kivágtam, ezt használtam a részletes O-PLS diszkriminancia analízisek elkészítéséhez. A másikban a DRC jeleket meghagytam, ez szolgált a STOCSY elemzések kiindulási adataként. Mindkét készletet PQN módszerrel normalizáltam, az első esetben az eredményeimet teljes területre normalizált spektrumsorozaton is ellenőriztem. A spektrumok jeleinek kémiai eltolódás ingadozását RSPA módszerrel korrigáltam. Az O-PLS-DA modellek segítségével ennél a kísérletnél is időpontról időpontra összehasonlítottam a kezelt állatok csoportjainak spektrumait a kontroll állatokéval, minden dóziscsoporton belül követtem a metabolitok időbeli fluktuációját, és összevettem az LD és HD csoport spektrumait 8 és 24 óránál. A krumból és metabolitjainak jeleit STOCSY módszerrel azonosítottam, és így vizsgáltam kapcsolataikat az endogén kismolekulákhoz is.

4.2.2.3. Ceruleinnel előidézett exokrin hasnyálmirigy-gyulladás

Az ^1H NMR spektrumokat MATLAB (R2008a verzió) szoftverbe importáltam, és a víz ($\delta=4,7-4,9$ ppm), a TSP ($\delta=-0,2-0,2$ ppm), valamint a karbamid ($\delta=5,6-6,0$ ppm)

jeléhez tartozó régiókat kivágtam. Csak PQN módszerrel normalizált spektrumokat használtam, és a kémiai eltolódás elmozdulásokat RSPA módszerrel minden dóziscsoportnál korrigáltam. Az értékelést a 4.2.3 fejezetben ismertetett módszerrel végeztem.

4.2.3. Klaszteranalízisen alapuló adatelemző módszer (CLASSY)

A módszer tesztelésére és iteratív fejlesztésére, valamint az alap beállítási paraméterek optimalizálására néhány egyéb COMET kísérlet mellett elsősorban az L-arginin modelltoxinnal végzett kísérletet használtuk. Validálás céljából további hét COMET kísérlet részletes értékelését is elvégeztük.

Az adatok előkészítése a korábbiakban leírtaknak megfelelően történt (szoftver: MATLAB R2008a verzió). Csak PQN módszerrel normalizált spektrumokat használtunk, és a kémiai eltolódás elmozdulásokat RSPA módszerrel minden dóziscsoportnál korrigáltuk. A korrelációs mátrix a jelcsúcsként azonosított adatpontok figyelembevételével készült. A matematikai háttér kidolgozása és a program megírása túlnyomó részben Steven Robinette és Kirill A. Veselkov kemometrikusok munkája, így a vonatkozó részeket csak röviden ismertetem. (Részletek a publikációban).

A „lokális” (szerkezeti okokból korrelált) jelcsoportok egymáshoz rendelése a többkomponensű elegyek TOCSY spektrumainak elemzésére korábban kifejlesztett DemixC [131] algoritmus alkalmazásával történt, azzal a különbséggel, hogy itt a kiindulási adattábla az egydimenziós ^1H NMR spektrumok alapján generált korrelációs mátrix volt. A módszer mégsem egyszerűen a korábban bemutatott STOCSY elemzés továbbfejlesztése és klaszteranalízissel való kombinálása, mert a bemeneti információt nem közvetlenül a korrelációs mátrix, hanem az ebből rekurzívan emelkedő korrelációs küszöbértékekkel előállított bináris mátrix adja. Így a szerkezeti kapcsolat jobban elválasztható a biológiai okokra visszavezethető kapcsolattól, és egyértelműbbé válik a klaszteranalízishez használt alapjelek meghatározása, valamint a többi (átfedésekkel jobban terhelt) jel csoportokhoz sorolása.

A „globális” (biokémiai okokból korrelált) klaszterek meghatározása klasszikus hierarchikus csoportelemzéssel történt, ahol a korrelációs koefficiens értékét úgy alakítottuk távolsággá, hogy az -1 esetén 1 , 1 esetén 0 értéket vegyen fel.

A „heat map” ábránál a klaszterezett csúcsok intenzitását a kontroll medián spektrum adott jelének intenzitásához viszonyítjuk, és logaritmikus színskála segítségével jelenítjük meg. A klaszterezett korrelációk ábrájának és a „heat map” ábrának az oszlopai azonosak, tehát a kettő együtt, egyszerre mutatja az adott kísérletről kinyerhető korrelációs és kvantitatív információt.

5. Eredmények

5.1. Exokrin hasnyálmirigy-gyulladást előidéző modelltoxinok

5.1.1. L-argininnel előidézett exokrin hasnyálmirigy-gyulladás

A kis dózissal kezelt állatok csoportja ($n=10$) a válaszadás erőssége szempontjából egységesnek mutatkozott mind a szövettani és klinikai kémiai, mind a metabonomikai vizsgálatok alapján. A nagy dózissal kezelt állatok ($n=20$) közül kettő 24 órával az injekció beadása után elpusztult (őket *erős válaszadóknak* tekintettem, $n=2$), míg három kísérleti állat meglepő rezisztenciát mutatott az arginin-toxicitással szemben. Őket a *gyenge válaszadók* csoportjába soroltam ($n=3$), amit a morfológiai szervkárosodást jellemző minimális szövettani pontszámaik is indokoltak. A fenti csoportok klinikai kémiai adatait és szérum- valamint vizeletspektrumait a statisztikai elemzéskor külön vizsgáltam a *normál válaszadók* csoportjától ($n=15$). Az eredmények ismertetésénél a továbbiakban a nagy dózissal kezelt HD csoport alatt csak a *normál válaszadókat* értem.

5.1.1.1. Szövettan

A kis dózissal kezelt állatok máj-, vese- és hasnyálmirigy-szöveteinek sejtes szerkezete minden vizsgált időpontban normális volt. Néhány állatnál helyenként gyulladós infiltrátumot lehetett látni a pankreász-szövetben, de ez a kontroll állatoknál is előfordult. A HD csoportban néhány, 48 óra után elaltatott állatnál minimális/enyhe atrófia jelei mutatkoztak a májszövetekben, ám a korábbi megfigyelésekkel összhangban a legsúlyosabban érintett szerv a hasnyálmirigy volt. A 48 órás mintákban a HD csoport legtöbb állatánál a zimogén granulomok számának jelentős/súlyos csökkenését és közepes/jelentős mértékű acináris atrófiát, intersticiális ödémát, és gyulladást lehetett megfigyelni. 168 órával az arginin injekció beadása után ennek a csoportnak a pankreász-mintáira a zimogén granulomok majdnem teljes hiánya és súlyos atrófia volt jellemző, ugyanakkor néhány állatnál regenerálódásra utaló morfológiai jegyeket is lehetett látni. A vese szövettani elemzése egyik időpontban sem

talált patológiás folyamatokra utaló jeleket. A szövettani értékelés eredményét a 5. táblázat foglalja össze.

Szövet	Morfológiai diagnózis	Hely	Kontroll		Kis dózis		Nagy dózis	
			48h	168h	48h	168h	48h	168h
Pancreas	apoptózis	acinusok	0	0	0	0,2	0,5	0
Pancreas	atrófia	acinusok	0	0	0	0	3,16	5
Pancreas	degeneráció	acinusok	0	0	0	0,8	0,5	0
Pancreas	ödéma	intersticiális	0	0	0	0,4	2,83	0
Pancreas	szaponifikáció és nekrozis	peripancreatikus zsír	0	0	0	0	2	1,8
Pancreas	mitótikus alakok (regenerálódás)	acinusok	0	0	0	0	0	1,7
Pancreas	gyulladás	acinusok	0	0	0	0	3	0,4
Pancreas	zimogén szemcsék számának csökkenése	acinusok	1	1	1	1	4	5
Peritoneum	szaponifikáció és nekrozis		0	0	0	0	2,66	0
Máj	atrófia	pan-lobularis	0	0	0	0	1,33	0
Máj	glikogén leépülés	periportalis	0	0,4	0	0,8	0	0,8
Máj	hepatocelluláris nekrozis	random	0	0,2	0,2	0,2	0,5	0

5. táblázat. Szövettani elváltozások és mértékük a kontroll, kis dózissal kezelt és nagy dózissal kezelt állatok csoportjában. Modelltoxin: L-arginin. A pontozás a 4.1.1.2. fejezetben leírtaknak megfelelően történt.

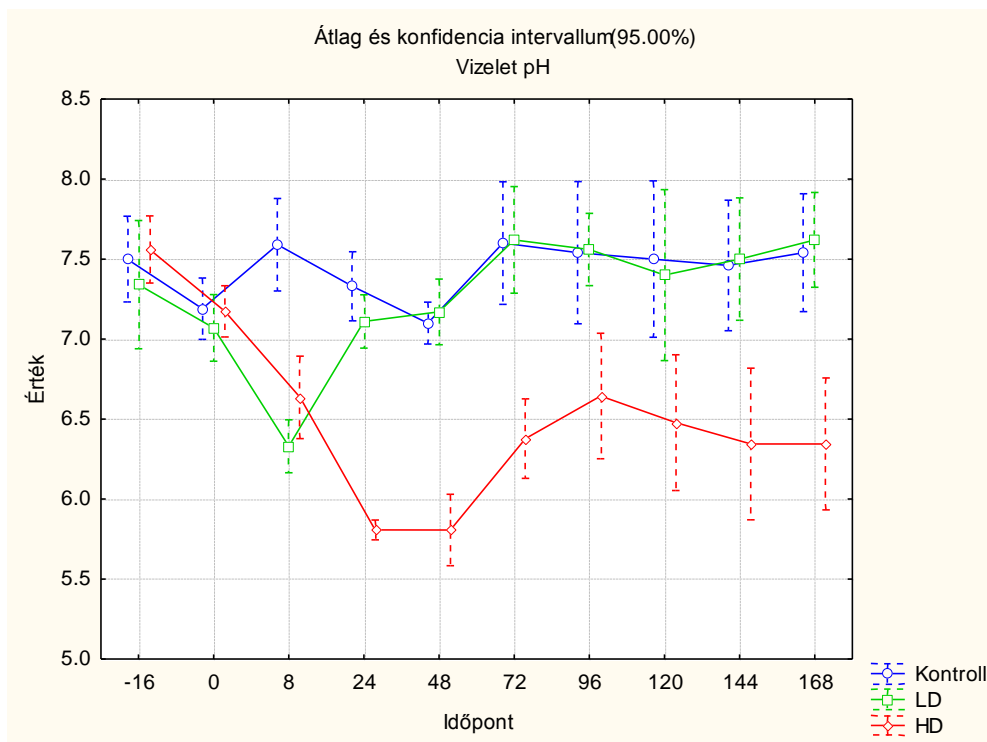
5.1.1.2. Klinikai kémiai mérések és súlyadatok

Az LD csoportban a pankreász és az agy súlyának aránya nem mutatott eltérést a kontroll állatokhoz képest. A nagy dózissal kezelt csoportban a szöveti ödémának köszönhetően a 48 óra után elaltatott állatokban ez az arány a kontrollhoz képest magas volt ($p>0,05$), míg a 168 óra után elaltatott állatoknál statisztikailag szignifikáns 61%-os csökkenést lehetett megfigyelni, mely a jelentős szöveti atrófia következménye (6. táblázat). Az állatok testsúlya a kis dózissal kezelt csoportban a kontrollnak megfelelően alakult. A HD csoport átlagos testsúlya ehhez képest 48 óránál $10,4\% \pm 2,3\%$ csökkentést mutatott, míg 168 óránál nagy szórás mellett az állatok felénél súlynövekedést lehetett látni. (Az átlagos súlynövekedés a csoportban $0,8\% \pm 7,8\%$).

Kontroll	Kis dózis	Nagy dózis	Kontroll	Kis dózis	Nagy dózis
48 h			168 h		
0,38 ± 0,03	0,38 ± 0,04	0,47 ± 0,11	0,42 ± 0,10	0,43 ± 0,07	0,16 ± 0,05 *

6. táblázat A pankréasz és az agy súlyaránya a kontroll, kis dózissal kezelt és nagy dózissal kezelt csoportban. Modelltoxin: L-arginin. Átlag ± SD. (*) $p < 0,05$.

A vizeletminták klinikai kémiai vizsgálatának tanulsága szerint az arginin-hidroklorid injekció dózistól függő mértékben savas tartományba tolta az állatok vizeletének pH-ját (7. táblázat). Az LD csoportban a pH csak a 8 h mintákban volt szignifikánsan alacsonyabb a kontrollnál, a nagy dózissal kezelt állatok vizelete azonban az injekció beadása után a kísérlet teljes időtartama alatt a savas tartományban maradt, legszélsőségesebb értékét (pH=5,5-6,0) a 24. és 48. órából származó mintákban érve el (8. ábra).



8. ábra. A vizeletminták pH-jának alakulása a kontroll, kis dózissal kezelt (LD), és nagy dózissal kezelt (HD) állatoknál, időpontok szerinti bontásban. Modelltoxin: L-arginin.

Mért paraméter	Kontroll	Kis dózis	Nagy dózis
	-16 h		
pH	7,56 ± 0,31	7,34 ± 0,56	7,56 ± 0,38
fehérje	0,47 ± 0,21	0,41 ± 0,12	0,43 ± 0,19
glükóz	0,82 ± 0,25	0,97 ± 0,24	0,99 ± 0,22
0 h			
pH	7,19 ± 0,27	7,07 ± 0,29	7,17 ± 0,29
fehérje	0,58 ± 0,19	0,58 ± 0,21	0,55 ± 0,23
glükóz	1,59 ± 0,43	1,85 ± 0,47	1,82 ± 0,30
8 h			
pH	7,59 ± 0,40	6,33 ± 0,23 *	6,64 ± 0,45 *
fehérje	0,38 ± 0,16	0,51 ± 0,14	0,76 ± 0,18 *
glükóz	0,34 ± 0,16	0,57 ± 0,13	8,17 ± 3,71 *
24 h			
pH	7,33 ± 0,30	7,11 ± 0,23	5,81 ± 0,11 *
fehérje	0,64 ± 0,20	0,63 ± 0,18	1,28 ± 0,48 *
glükóz	1,35 ± 0,29	1,41 ± 0,33	4,61 ± 2,12 *
48 h			
pH	7,10 ± 0,18	7,17 ± 0,29	5,81 ± 0,40 *
fehérje	0,71 ± 0,21	0,68 ± 0,17	1,62 ± 0,57 *
glükóz	1,45 ± 0,27	1,81 ± 0,39	3,07 ± 0,78 *
72 h			
pH	7,60 ± 0,31	7,62 ± 0,27	6,38 ± 0,32 *
fehérje	0,69 ± 0,17	0,71 ± 0,16	0,65 ± 0,20
glükóz	1,23 ± 0,36	1,54 ± 0,43	2,75 ± 0,82 *
96 h			
pH	7,54 ± 0,36	7,56 ± 0,18	6,64 ± 0,51
fehérje	0,75 ± 0,16	0,78 ± 0,16	0,32 ± 0,09 *
glükóz	1,03 ± 0,29	1,25 ± 0,34	1,11 ± 0,36
120 h			
pH	7,50 ± 0,39	7,40 ± 0,43	6,48 ± 0,55
fehérje	0,76 ± 0,15	0,87 ± 0,20	0,27 ± 0,13 *
glükóz	1,06 ± 0,24	1,23 ± 0,33	0,96 ± 0,23
144 h			
pH	7,46 ± 0,33	7,50 ± 0,31	6,34 ± 0,62
fehérje	0,84 ± 0,22	0,87 ± 0,21	0,27 ± 0,10 *
glükóz	1,29 ± 0,40	1,45 ± 0,32	1,18 ± 0,35
168 h			
pH	7,54 ± 0,30	7,62 ± 0,24	6,34 ± 0,54
fehérje	0,90 ± 0,23	0,94 ± 0,18	0,35 ± 0,18 *
glükóz	1,16 ± 0,25	1,34 ± 0,37	1,29 ± 0,55

7. táblázat. Vizeletminták klinikai kémiai adatai a kontroll, kis dózissal kezelt és nagy dózissal kezelt csoportban. Modelltoxin: L-arginin. Átlag ± SD. (*) $p < 0,01$. Mértékegységek: fehérje g/L; glükóz mmol/L

A kísérleti patkányok normális körülmények között kis mennyiségű (0,8 g/l) fehérjét is ürítenek a vizelettel. A HD csoport állatainak vizeletében a fehérje mennyisége a 24 h és a 48 h mintákban közel megduplázódott, majd csökkenni kezdett, és a 96 h mintától a kísérlet végéig alacsony értéken maradt. A csoport vizeletmintáinak glükóz tartalma 8 h - 72 h között szignifikánsan magasabb volt, mint a kontroll állatoké (7. táblázat).

A szérum amiláz értéke a nagy dózissal kezelt állatok 24 h mintáiban volt csak magas. A szérum urea nitrogén (BUN) szintje 24 órával az injekció beadása után szintén szignifikánsan megemelkedett ebben a csoportban, mely jól mutatja a nagy mennyiségű arginin közvetlen hatását az urea-ciklusra (8. táblázat).

Mért paraméter	Kontroll	Kis dózis	Nagy dózis
	24 h		
Urea N (μM)	4427 \pm 828	4712 \pm 405	8949 \pm 2793 *
ALT (IU/L)	39 \pm 8	40 \pm 5	172 \pm 70 *
AST (IU/L)	127 \pm 16	117 \pm 10	444 \pm 131 *
ALP (IU/L)	422 \pm 131	441 \pm 60	339 \pm 91
Glükóz (mM)	6,84 \pm 0,62	6,73 \pm 0,91	4,54 \pm 0,43 *
Teljes fehérje (g/L)	66 \pm 4	66 \pm 4	67 \pm 4
Albumin (g/L)	36 \pm 2	35 \pm 1,5	36 \pm 2
48 h			
Urea N (μM)	4784 \pm 407	4855 \pm 541	5057 \pm 1784
ALT (IU/L)	32 \pm 8	32 \pm 3	92 \pm 24 *
AST (IU/L)	88 \pm 17	94 \pm 13	218 \pm 37 *
ALP (IU/L)	354 \pm 115	331 \pm 41	224 \pm 64
Glükóz (mM)	14,96 \pm 2,05	13,20 \pm 0,73	9,69 \pm 1,66 *
Teljes fehérje (g/L)	53 \pm 2	52 \pm 1	53 \pm 2
Albumin (g/L)	30 \pm 1	29 \pm 0,5	28 \pm 1 *
168 h			
Urea N (μM)	4712 \pm 732	5069 \pm 687	3332 \pm 994 *
ALT (IU/L)	38 \pm 10	38 \pm 4	56 \pm 15 *
AST (IU/L)	124 \pm 41	114 \pm 16,5	103 \pm 11
ALP (IU/L)	363 \pm 57	398 \pm 56	240 \pm 87 *
Glükóz (mM)	11,97 \pm 2,09	13,39 \pm 2,15	8,23 \pm 1,60 *
Teljes fehérje (g/L)	52 \pm 1	54 \pm 1,5	47 \pm 3 *
Albumin (g/L)	29 \pm 0,5	29 \pm 1	27 \pm 1,5 *

8. táblázat. Szérumminták klinikai kémiai adatai a kontroll, kis dózissal kezelt és nagy dózissal kezelt csoportban. Modelltoxin: L-arginin. Átlag \pm SD. (*) $p < 0,05$.

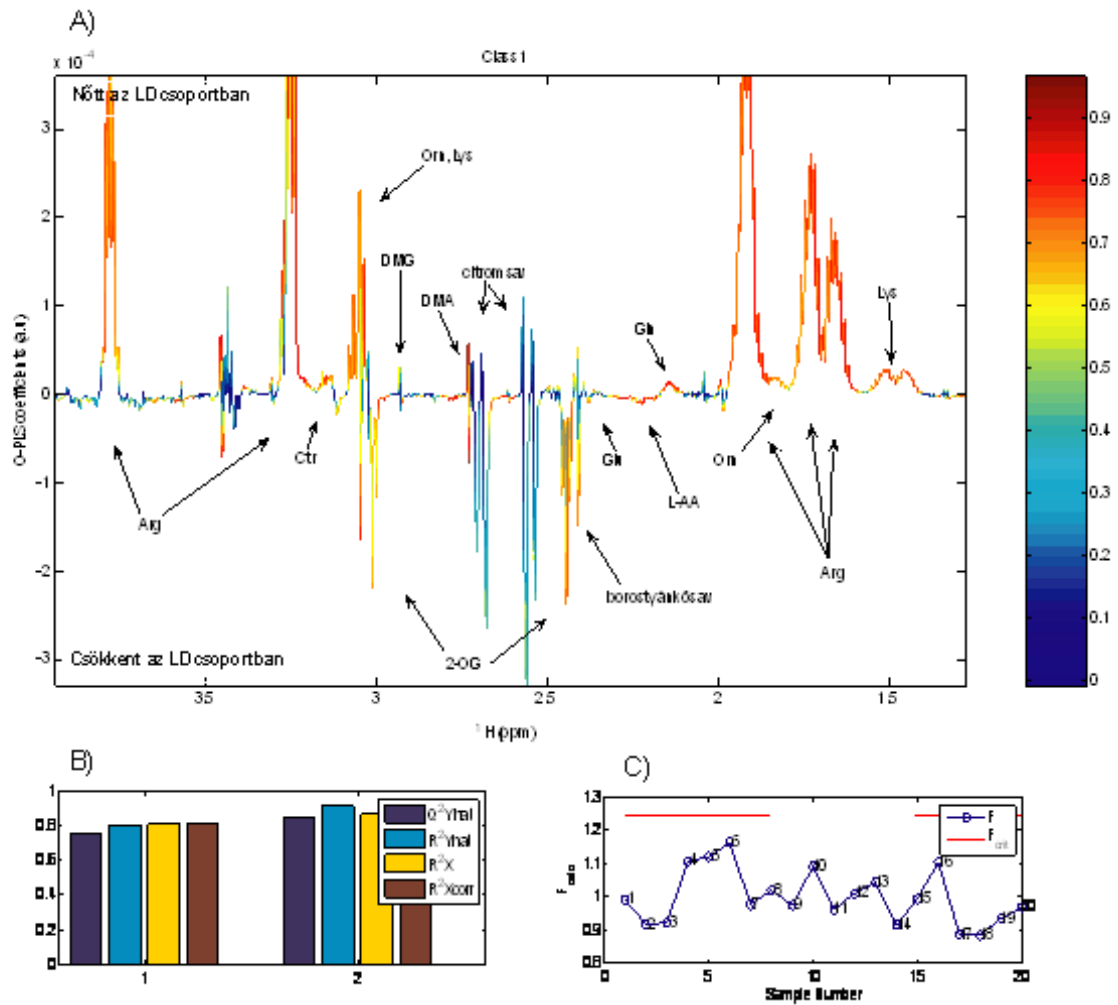
A BUN az arginin-felesleg metabolizálása és eliminálása után visszatért a normális szintre a 48 órás szérumminták tanulsága szerint, majd a 168. órás mintákban a kontrollhoz képest csökkenést mutatott. Ez utóbbi a 168. óránál mért alacsony szérum fehérje tartalommal együtt az exokrin hasnyálmirigy csökkent működéséből adódó

elégtelen fehérje-emésztés következménye lehet. Általánosan megfigyelhető továbbá a HD szérumminták magasabb ALT, AST és alacsonyabb ALP tartalma, valamint a szérum glükóz szint csökkenése a kontrollhoz képest (8. táblázat).

5.1.1.3. Metabonomikai elemzés

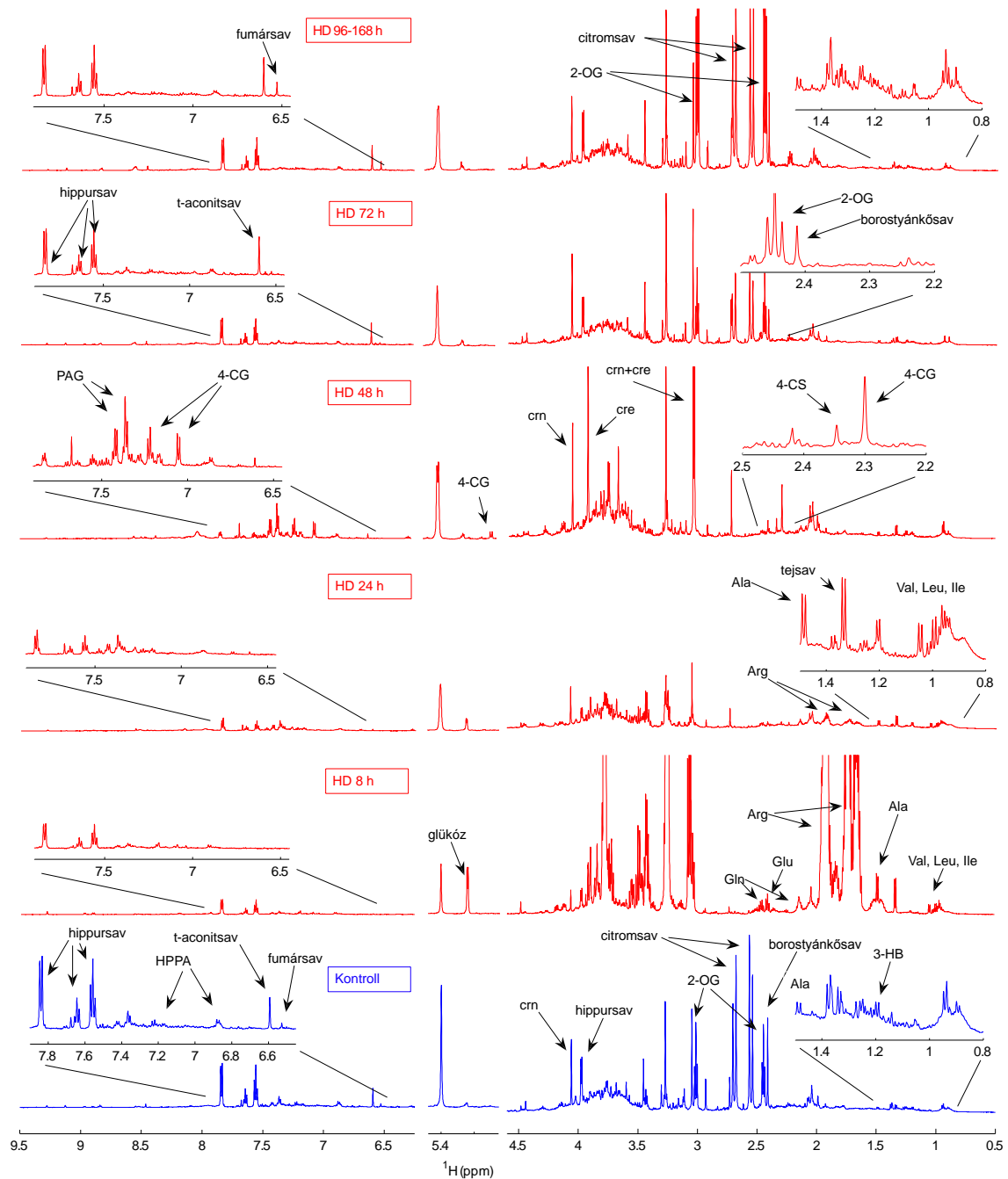
A kis dózissal kezelt állatok vizelete 8 óránál a kontrollhoz képest magasabb arginin, ornitin és citrullin szintet mutatott, mely az emelkedett szérum urea szinttel összhangban az urea-ciklus aktivitásának növekedésére utal (9. ábra). Ezek mellett a lizin, a glutaminsav és a glutamin, valamint a tejsav relatív koncentrációja emelkedett meg. Csökkenést lehetett látni a 2-amino-adipinsav szintjében és a citrátkör NMR spektroszkópiával látható intermediereinek (citromsav, 2-oxoglutársav, borostyánkősav és fumársav) koncentrációjában. Míg a citrátkör-metabolitok alacsony ürítése az átmeneti jellegű metabolikus acidózis következménye [132,133], a 2-amino-adipinsav mennyiségének csökkenése a glutaminsav és glutamin szint párhuzamos emelkedésével fokozott transzaminációként is értelmezhető. A felsorolt eltéréseket a többi időpont LD mintáiban nem lehetett látni, egyedül a metabolizálatlan arginin ürítése folytatódott a 8. órán túl.

A nagy dózissal kezelt állatok 8 h vizeletmintáiban az arginin és az ornitin relatív koncentrációja magasabb volt, mint az LD állatoknál, és mindkét aminosav szintje magas volt a 24 h mintákban is. A PQN módszerrel normalizált spektrumokon a jelek integráljai alapján becsülni lehetett az ürített arginin arányát a két kezelt csoportban. A 24 óra alatt ürített arginin teljes mennyisége a HD állatoknál 4,8-szor magasabb volt, mint a kis dózissal kezelt csoportban, 15%-os szórást mutatva szemben az LD csoport 4 százalékával. Ezek alapján a vizeletbe közvetlenül jutó arginin mennyisége a dózis arányához képest (1000 mg/ml vs. 4000 mg/ml) magasabb volt a HD csoportban, ami a metabolizáló kapacitás telítettségét mutatja. A nagyobb szórás a metabolizáló-képességbeli egyéni eltérésekre utal. A *gyenge válaszadók* 8 h és 24 h mintáinak teljes arginin mennyisége csak 46%-a volt a *normál válaszadók* átlagának, és az aminosav eliminációja elnyújtottabb profilt mutatott, ami arra enged következtetni, hogy az arginin lebontás hatékonysága és a toxicitás mértéke összefügg.



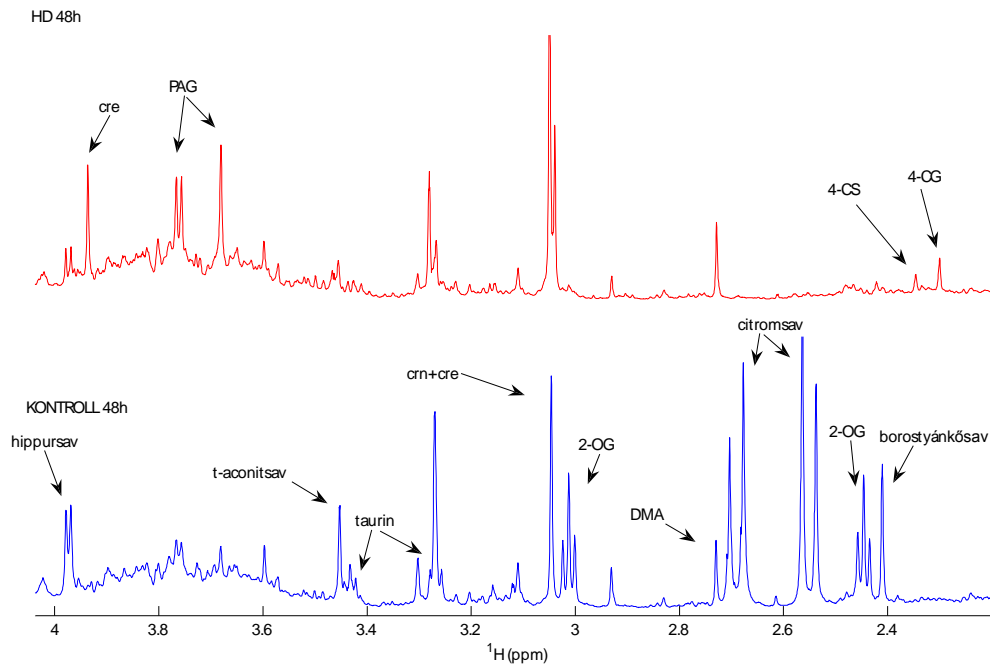
9. ábra. A) A kontroll és a kis dózissal kezelt (LD) csoportba tartozó állatok 8. órában gyűjtött vizeletmintáinak 600 MHz ^1H NMR spektrumai alapján készült O-PLS-DA együttható ábra. A felfelé mutató jelek metabolitjainak koncentrációja nőtt az LD állatok mintáiban, a lefele nézőké csökkent a kontrollhoz képest. A színskála a metabolit diszkriminatív súlyát jelzi. A két alsó ábrán (B és C) a modell jóslóképességét mutató paraméterek és a keresztvalidálás eredménye látható. Modelltoxin: L-arginin. Jelmagyarázat: Arg, L-arginin; 2-OG, 2-oxoglutársav; Ctr, citrullin; Glu, glutaminsav; Gln, glutamin; Orn, ornitin; Lys, lizin; L-AA, L-amino-adipinsav; DMA, dimetilamin; DMG, dimetil-glicin

A nagy dózissal kezelt állatok 8 óránál gyűjtött mintáiban a citrullin, lizin, glutaminsav és glutamin szintje meghaladta az LD csoportnál látott szintet, a valin, leucin, izoleucin és alanin koncentrációk pedig kontrollnál magasabbak voltak mind a 8, mind a 24. órás mintákban (10. ábra).



10. ábra. A kontroll állatok beadást követő 48. órában gyűjtött vizeletmintáinak és a nagy dózissal kezelt (HD) csoporthoz tartozó állatok 8.-168. óra között gyűjtött vizeletmintáinak reprezentatív normalizált 600 MHz ^1H NMR spektrumai. Modelltoxin: L-arginin. Jelmagyarázat: HPPA, hidroxi-fenil-propionsav; Arg, arginin; Val, valin; Leu, leucin; Ile, izoleucin; 4-CG, 4-krezol-glükuronid; 4-CS, 4-krezol-szulfát; 2-OG, 2-oxoglutársav; PAG, fenil-acetil-glicin; cre, kreatin; crn, kreatinin; Glu, glutaminsav; Gln, glutamin; Ala, alanin; 3-HB, 3-hidroxi-vajsav.

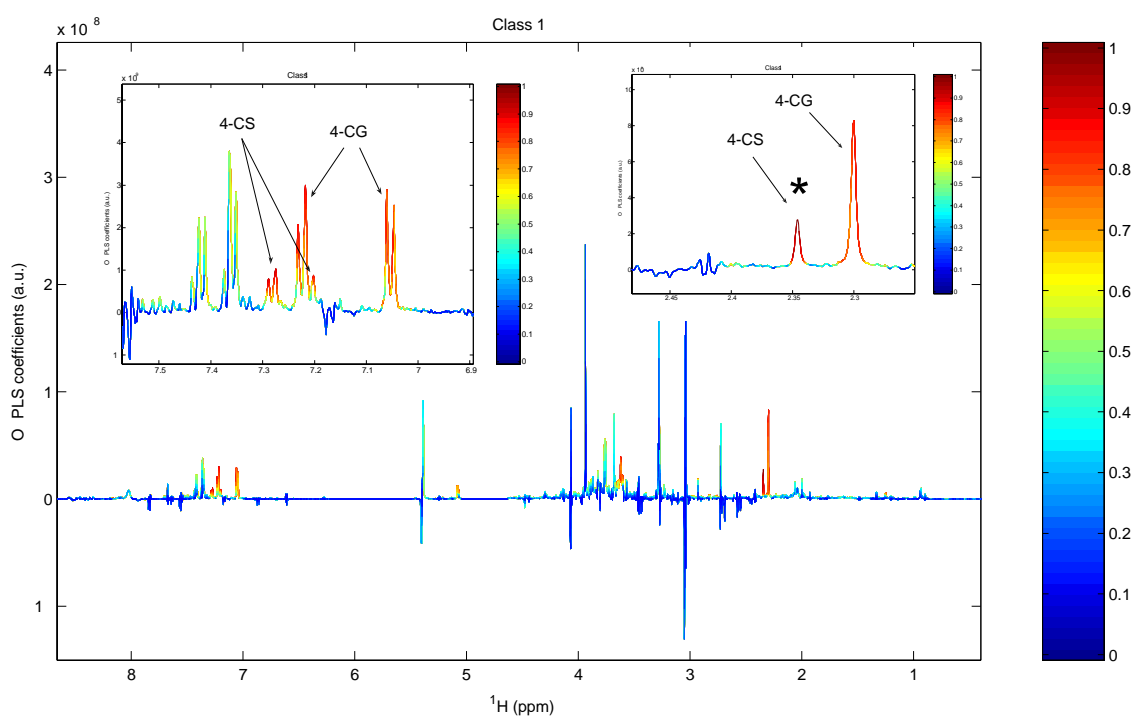
A citrátkör-intermedierek koncentrációjának esése már 8 óránál is meghaladta az LD csoport mintáinál tapasztaltat, a 24. és a 48. órában gyűjtött vizeletben pedig (a minták szélsőségesen savas pH értékének megfelelően) rendkívül lecsökkent a mennyiségük. Az állatok többségénél szintjük az NMR-érzékenység alatt maradt, így a jeleik teljesen hiányoztak a spektrumból (10. és 11. ábra). A HD csoport vizeletmintáinak pH-ja ugyan végig savasabb volt, mint a kontroll, de 72 óránál már elérte a fiziológiás tartomány alsó értékét. A citrátkör intermedierek mennyisége ezzel párhuzamosan nőtt, majd a 96 órás minta után a citromsav, 2-oxoglutársav és fumársav szintje lényegesen a kontroll értéke fölé emelkedett (10. ábra). A vizelet glükóz szintje a HD csoportnál az első 8 órában jelentősen megnőtt, majd folyamatosan csökkent, 72 óránál érve el a kontroll értékét.



11. ábra. A kontroll és a nagy dózissal kezelt (HD) csoportba tartozó állatok 48. órában gyűjtött vizeletmintáiról készült, normalizált 600 MHz ^1H NMR spektrumok mediánjai. Modelltoxin: L-arginin. Jelmagyarázat: 4-CG, 4-krezol-glükuronid; 4-CS, 4-krezol-szulfát; 2-OG, 2-oxoglutársav; PAG, fenil-acetil-glicin; cre, kreatin; crn, kreatinin; DMA, dimetilamin.

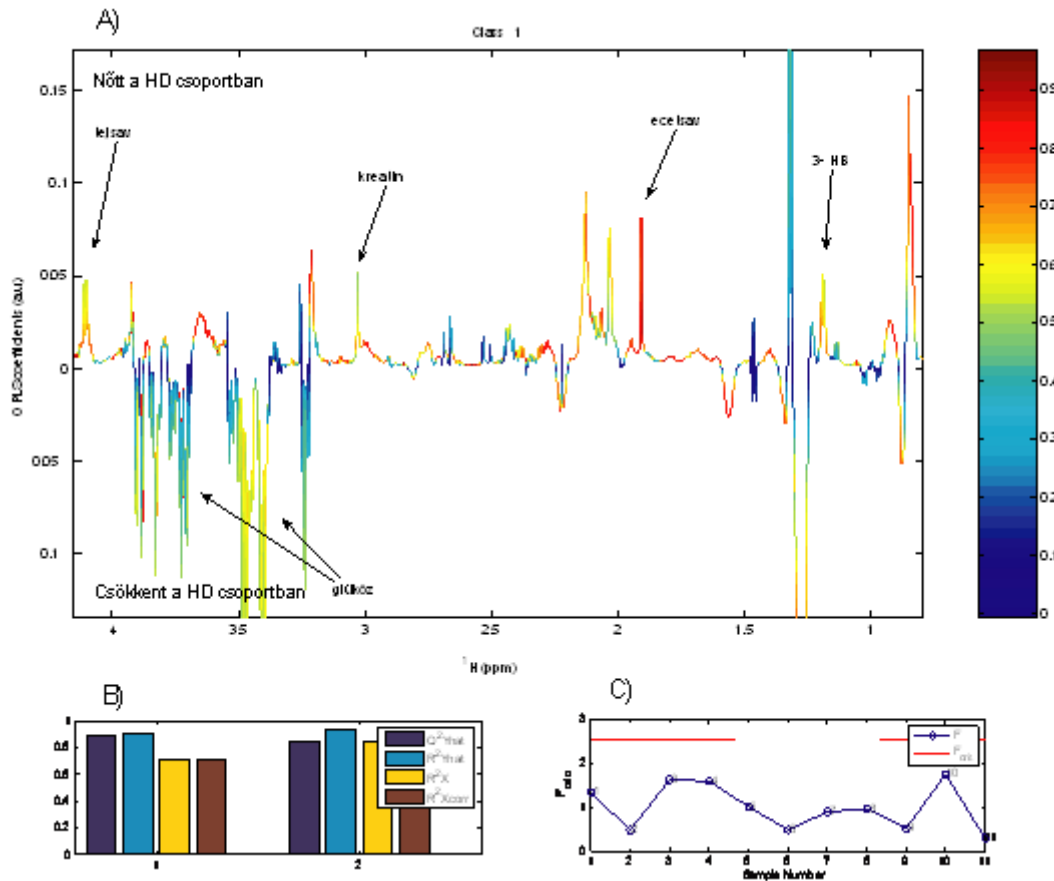
Azon kismolekulák közül, melyek az emlős szervezet és a vele szimbiózisban élő bélbaktériumok közös anyagcsere-termékei [134] a hippursav és a 3- valamint 4-hidroxi-fenil-propionsav (HPPA) mennyisége volt alacsony a kontrollhoz képest a 8 órás mintákban. Szintjük később is csak lassan regenerálódott. A 48 órás vizeletben minden HD állat esetében magasabb volt a fenil-acetil-glicin (PAG), a kreatin és a

kreatinin mennyisége, mint a kontrollban és nagyobb mennyiségben jelentek meg 4-krezol metabolitok is (11. ábra). A STOCSY elemzés alapján a 4-krezol-glükuronid (4-CG $\delta=7.23, 7.05, 5.08, 2.30$ ppm) és a 4-krezol-szulfát (4-CS $\delta=7.29, 7.21, 2.34$ ppm) koncentrációja a 48 órás mintákban ($n=15$) erősen korrelált volt ($r^2=0.85$) (12. ábra). A spektrumok részletes, egyenkénti átvizsgálásakor nyilvánvalóvá vált, hogy egyes állatoknál ezek a jelek már a 24 h vizeletben is megtalálhatóak, másoknál pedig még a 72 h mintában is láthatóak. A vizelet 4-krezol-metabolit tartalma szempontjából tehát meg lehetett különböztetni *gyors* és *lassú válaszadókat*. A jelek intenzitásának vizsgálata ezen túl rámutatott, hogy az állatok tovább is csoportosíthatók *erős* és *gyenge válaszadók* csoportjaira. A krezol jelek szintje a STOCSY analízis alapján nem korrelált a kreatin és a kreatinin koncentrációjával, viszont kapcsolatot mutatott a fenil-acetil-glicin vizeletbeli szintjével ($r^2=0.6$) (12. ábra).



12. ábra. A nagy dózissal kezelt állatok ($n=15$) 48. órában gyűjtött vizeletmintáinak 600 MHz ^1H NMR spektrumai alapján készült 1D STOCSY ábra. Modelltoxín: L-arginin. A kiindulási csúcs a 4-krezol-szulfát (4-CS) egyik jele $\delta=2.34$ (*). Erős ($r^2 > 0.85$) a korreláció a kiindulási csúcs és a 4-krezol-szulfát többi jele között ($\delta=7.29, 7.21, 2.34$), valamint a 4-krezol-glükuronid (4-CG) jeleivel ($\delta=7.23, 7.05, 5.08, 2.30$).

A szérum minták O-PLS-DA elemzése 48 óránál jól mutatta a megemelkedett kreatin szintet a nagy dózissal kezelt állatokban. Emellett a mintákban a kontrollnál magasabb volt a tejsav, a 3-hidroxi-vajsav és az ecetsav koncentráció, valamint alacsonyabb a glükóz koncentráció, amint azt a klinikai kémiai mérések is jelezték (13. ábra).

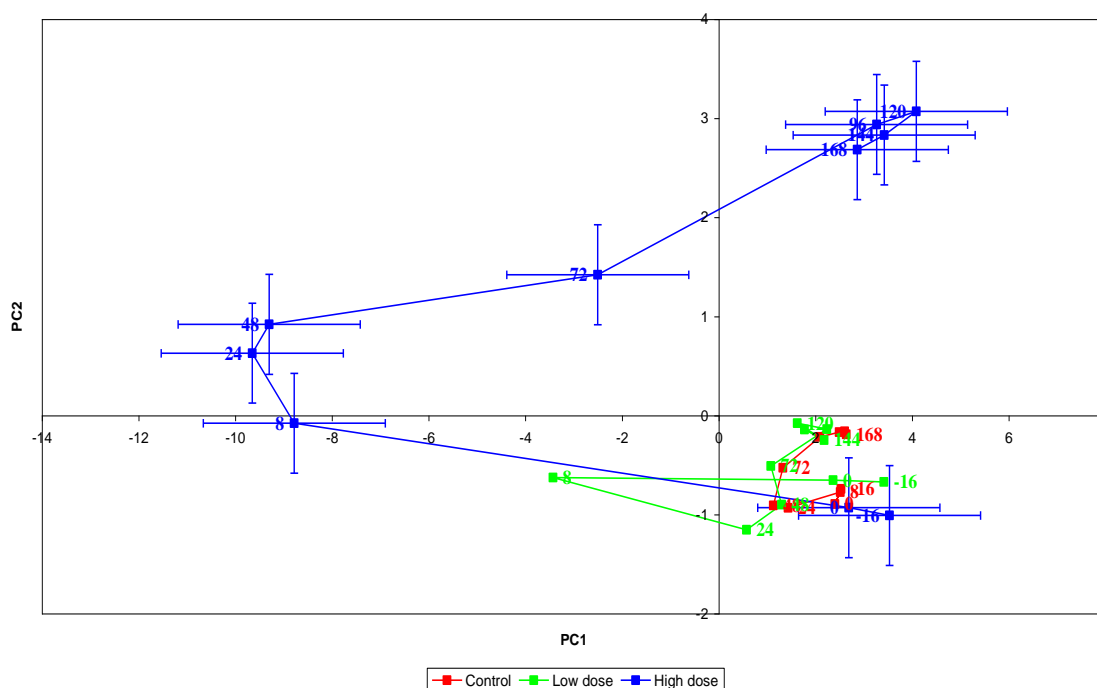


13. ábra. A) A kontroll és a nagy dózissal kezelt (HD) csoportba tartozó állatok 48. órán gyűjtött szérummintáinak Carr-Purcell-Meiboom-Gill spin-echo pulzusszekvenciával felvett 600 MHz ^1H NMR spektrumai alapján készült O-PLS-DA együttható ábra. A felfelé mutató jelek metabolitjainak koncentrációja nőtt az HD állatok mintáiban, a lefelé nézőké csökkent a kontrollhoz képest. A színskála a metabolit diszkriminatív súlyát jelzi. A két alsó ábrán (B és C) a modell jóslóképességét mutató paraméterek és a keresztvalidálás eredménye látható. Modelltoxin: L-arginin. Jelmagyarázat: 3-HB, 3-hidroxi-vajsav.

5.1.1.4. „Röppályák” vizsgálata

Ezt a ma már kissé elavultnak számító módszert csak érdekességképpen szeretném bemutatni [135]. A röppályaelemzés („trajectory analysis”) főkomponens-analízisen, majd az egyedi értékek átlagolásán alapul. Az ábrája gyorsan, egyszerűen elkészíthető, és összefoglaló képet ad a különböző dóziscsoportok mintáinak időbeli viselkedéséről.

Az argininnel végzett kísérlet ábráján jól látszik, hogy a patológiás események időben több fázisra bonthatók (14. ábra). A jobb alsó sarok az egészséges állatok által elfoglalt terület. A kísérlet ideje alatt ebben a térben mozogtak a kontroll állatok, és innen indultak (-16 h és 0 h) a kezelt állatok mintái is. A 8 h minták a HD és az LD csoportban ugyanabba az irányba mozdultak el, de az elmozdulás mértéke dóziszfüggő volt. A kis adaggal kezelt állatok mintái 24 órával az injekció beadása után visszatértek a kiindulási területre, tehát a szervezetben megjelenő arginin okozta traumából homeosztázisuk tökéletesen regenerálódott.



14. ábra. Röppályaelemzés ábrája, mely az L-argininnel előidézett exokrin hasnyálmirigy-gyulladás kísérletben gyűjtött vizeletminták 600 MHz ^1H NMR spektrumai alapján készült. A piros a kontroll, a zöld a kis dózissal kezelt, a kék a nagy dózissal kezelt, *normál válaszadó* állatok átlagértékeit és útvonalát jelöli. A számok a modelltvegyület beadásához képest eltelt órák számát jelzik.

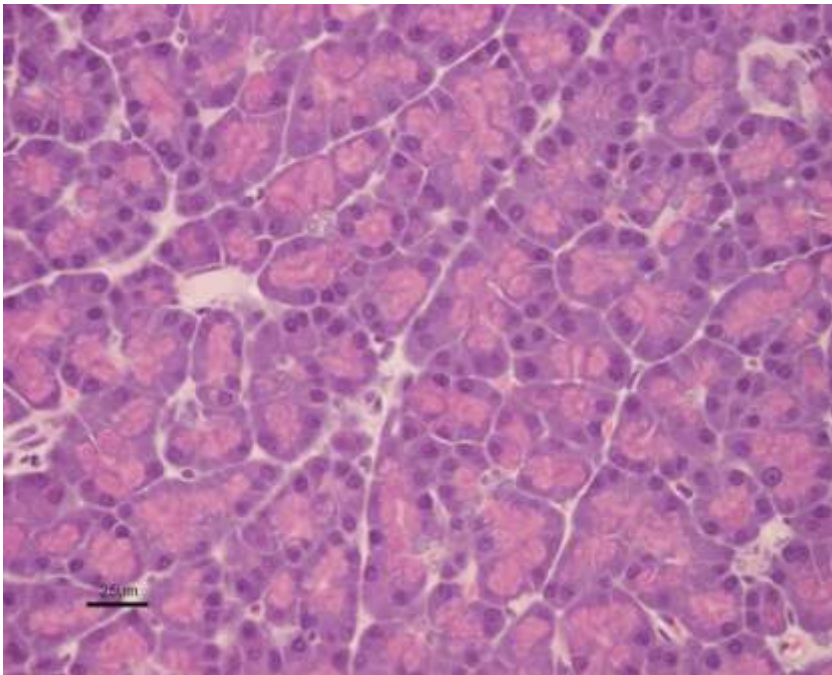
A nagy dózissal kezelt állatok mintái ezzel szemben két újabb régiót foglaltak el a virtuális metabolikus térben, a kettő közötti átmenetet a 72 órás minták jelzik. A HD csoport állatainak röppályája nyitott maradt, ami arra utal, hogy a kísérlet időtartama alatt szervezetük nem nyerte vissza a kiindulási egyensúlyt. A késői időpontok mintáinak csoportosulása stabil állapotot jelez ugyan, de az ábra alapján feltételezhető, hogy a teljes regenerálódás, ha egyáltalán lehetséges, időben elhúzódó folyamat lesz.

5.1.2. 1-ciano-2-hidroxi-3-buténnel előidézett exokrin hasnyálmirigy-gyulladás

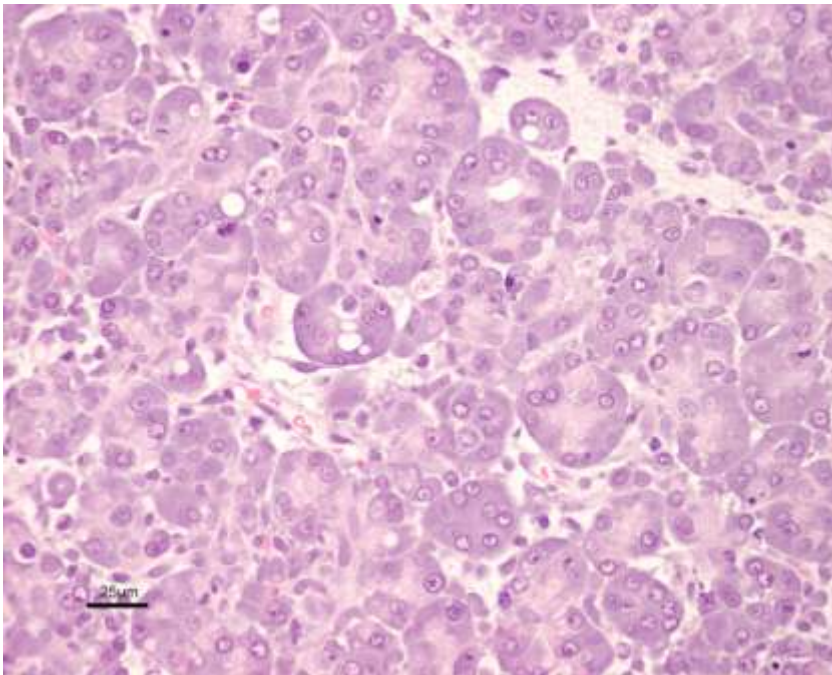
5.1.2.1. Szövettan

Mind a kontroll, mind a kis dózissal kezelt állatok májának és veséjének szövetszövetmintái normális sejtes szerkezetet mutattak. Az LD csoport állatainál 48 óránál a hasnyálmirigy szöveteken nem lehetett patológiás elváltozást látni, 168 óránál azonban enyhe/közepes mértékű multifokális acináris sejt pusztulás és minimális/enyhe multifokális zimogén granulom depléció volt jellemző a mintákra. A nagy dózissal kezelt állatok csoportjánál a hasnyálmirigy szöveteken megfigyelhető elváltozások összhangban álltak az irodalomban megtalálható korábbi kísérletek eredményeivel [105,106,110]. A 48 óránál elaltatott állatoknál az acináris sejtek enyhe/közepes mértékű diffúz atrófiáját lehetett látni, és kis mértékű apoptózisra utaló jeleket. (Ez utóbbi a késői mintavételi időponttal áll összefüggésben). Emellett a zimogén granulomok számának közepes/jelentős mértékű csökkenését, intersticiális ödémát, és enyhe szövetszöveti gyulladást lehetett megfigyelni (15. ábra). Hasnyálmirigy enzimek felszabadulása következtében kialakuló szövetszöveti nekrozist, önmérsztést csak egyetlen állat mintája mutatott, és az is csak enyhe mértékűnek minősült. A 168 órával a nagy dózisú injekció beadása után elaltatott patkányok mintáiban az acináris sejtek súlyos diffúz atrófiáját, jelentős mértékű/súlyos zimogén szemcse szám csökkenést és legtöbbször enyhe fibrózist lehetett megfigyelni (15. ábra). Két állat esetében a mintán regenerálódásra utaló morfológiai jegyeket is lehetett látni.

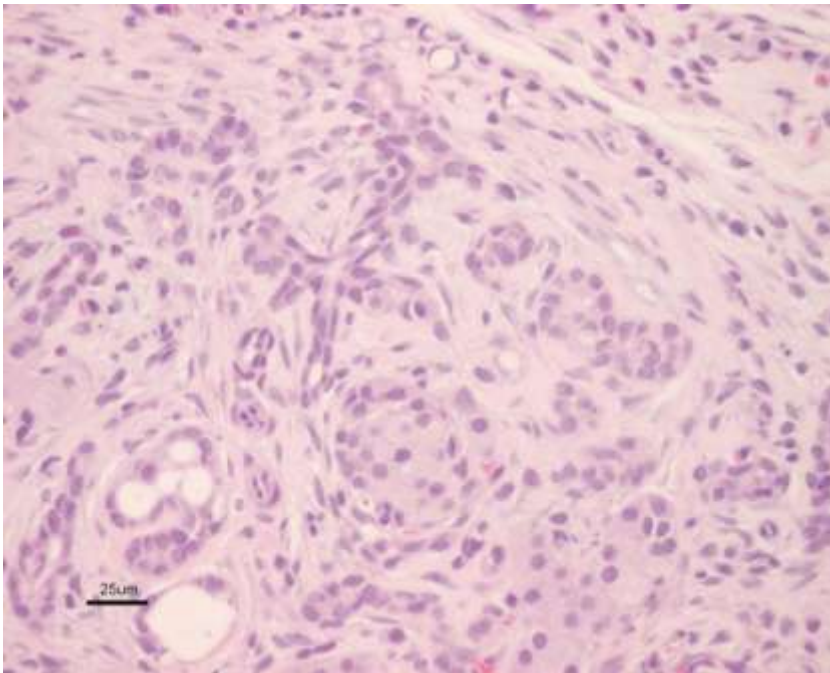
A)



B)



C)



15. ábra. Hasnyálmirigy-szövet fénymikroszkópos képe. A) Kontroll. B) Nagy dózissal kezelt, 48 óra után elaltatott állat. C) Nagy dózissal kezelt, 168 óra után elaltatott állat. Modelltoxin: CHB.

5.1.2.2.. Klinikai kémiai mérések és súlyadatok

A súlyadatok alakulását és a változást mutató szérum klinikai kémiai paramétereket számszerűleg a 9. és a 10. táblázat foglalja össze. A nagy dózissal kezelt csoport egyik kísérleti állatának klinikai kémiai eredményei szélsőséges értékeket mutattak. Májának és veséjének szövettani vizsgálata súlyos centrilobuláris és midzonális hepatocelluláris nekrozist és jelentős mértékű renális tubuláris nekrozist fedett fel. Mivel a csoport többi állatára ezek az elváltozások nem voltak jellemzőek, a kísérleti állatot kívülállónak tekintettem, és a mintáit a statisztikai elemzésből kizártam.

A HD csoport állatainak átlagos testsúlya a kontroll állatokéhoz képest 17%-kal maradt el a 48. órában, és 18%-kal a 168. órában (9. táblázat). A pankreász és az agy súlyának aránya 81%-kal emelkedett 48 óra után (intersticiális ödéma), és 63%-kal csökkent a 168. órában elaltatott állatokban (atrófia) (9. táblázat).

Súlyadatok (g)

Kontroll	Kis dózis	Nagy dózis	Kontroll	Kis dózis	Nagy dózis
48 h			168 h		
247,7 ± 11,7	239,4 ± 9,6	206,1 ± 9,5*	284,3 ± 8,5	281,4 ± 19,4	224,9 ± 26,3*

A pankreász és az agy súlyának aránya

Kontroll	Kis dózis	Nagy dózis	Kontroll	Kis dózis	Nagy dózis
48 h			168 h		
0,51 ± 0,06	0,59 ± 0,02	0,94 ± 0,24*	0,59 ± 0,09	0,61 ± 0,16	0,22 ± 0,04*

9. táblázat. Súlyadatok és a pankreász/agy súlyarány a kontroll, kis dózissal kezelt és nagy dózissal kezelt csoportban. Modelltoxin: CHB. Átlag ± SD. (*) $p < 0,05$.

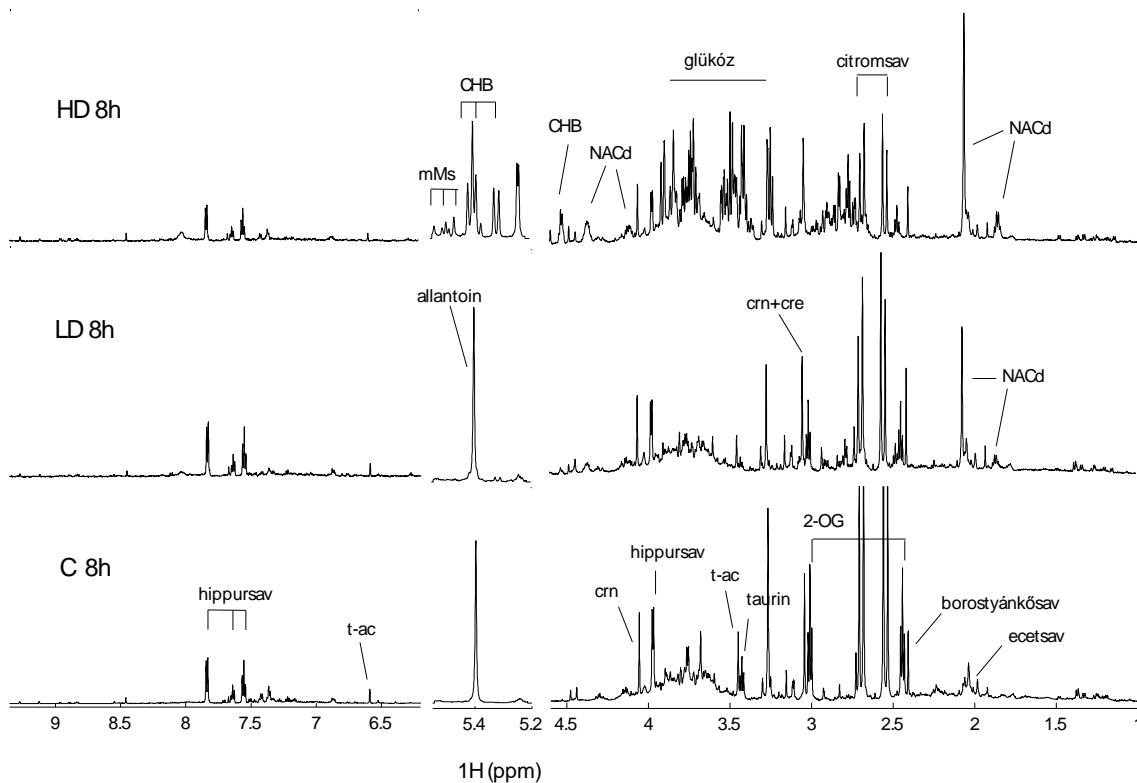
Megjegyzendő, hogy az utóbbi csoport állatainak belei kivétel nélkül puffadtak voltak és emésztetlen táplálékot tartalmaztak. A vizelet pH-ja az első 24 órában kissé alacsonyabb volt a HD állatoknál, mint a kontrollban, de a fiziológiás határon belül maradt, így nem kellett számolnunk a pH kismolekula-összetételt befolyásoló hatásával a vizeletminták metabonomikai elemzésénél. A vizelet cukortartalma nagy egyéni szórás mellett jelentősen megnőtt a nagy dózissal kezelt állatoknál a 8. óráig, majd a 48. órára visszatért a normális értékre, ami az endokrin funkció átmeneti zavarát valószínűsíti. A kezelt állatok mindkét csoportjában csökkent a vizelet fehérjetartalma 8 óránál. A fehérjekoncentráció a HD csoportban később mutatott ugyan némi emelkedést, de a kontrollnál szignifikánsan alacsonyabb maradt a 168. óráig. A kis dózissal kezelt állatok fehérjeürítése folyamatosan nőtt, és 168 óránál némiképp meg is haladta a kontroll értékét. A szérumban klinikai kémiai adataira általánosan jellemző, hogy meglehetősen nagy egyéni szórást mutattak. A szérumban amiláz szint a HD csoportban 24 óránál magasabb volt ugyan, mint a kontrollban, de a különbség statisztikailag nem volt szignifikáns, és biológiai szempontból sem volt jelentősként értelmezhető. A szérumban ALT és AST szint kis mértékű, de tartós csökkenése a nagy dózissal kezelt állatokban enyhe májtoxikus hatásra utal. A vércukorszint minden mérési időpontban alacsonyabb volt a HD csoportban, mint a kontrollban (10. táblázat).

Mért paraméter	Kontroll	Kis dózis	Nagy dózis
	24 h		
Urea N (μM)	5783 \pm 871	5176 \pm 564	5304 \pm 1278
ALT (IU/L)	38 \pm 4	35 \pm 5	62 \pm 18*
AST (IU/L)	93 \pm 13	86 \pm 8	138 \pm 27*
Glükóz (mM)	8,03 \pm 0,88	7,47 \pm 0,55	5,65 \pm 0,67*
Teljes fehérje (g/L)	60 \pm 3	60 \pm 2,5	62 \pm 4
Albumin (g/L)	32 \pm 1	33 \pm 1	34 \pm 2
	48 h		
Urea N (μM)	5855 \pm 696	5426 \pm 814	3927 \pm 1287*
ALT (IU/L)	41 \pm 11	39 \pm 5	42 \pm 6
AST (IU/L)	92 \pm 11	85 \pm 8	111 \pm 8*
Glükóz (mM)	14,16 \pm 1,44	14,87 \pm 2,05	8,62 \pm 1,39*
Teljes fehérje (g/L)	52 \pm 2	52 \pm 1	54 \pm 1,5
Albumin (g/L)	29 \pm 1	29 \pm 1	29 \pm 1
	168 h		
Urea N (μM)	5997 \pm 774	5712 \pm 564	3689 \pm 545*
ALT (IU/L)	34 \pm 7	32 \pm 4	67 \pm 16*
AST (IU/L)	89 \pm 17	90 \pm 9	102 \pm 11
Glükóz (mM)	13,11 \pm 1,78	13,61 \pm 1,79	9,64 \pm 1,30*
Teljes fehérje (g/L)	52 \pm 1	51 \pm 1	46 \pm 3
Albumin (g/L)	28 \pm 1	28 \pm 1	26 \pm 2

10. táblázat. Szérumminták klinikai kémiai adatai a kontroll, kis dózissal kezelt és nagy dózissal kezelt csoportban. Modelltoxin: CHB. Átlag \pm SD. (*) $p < 0.05$.

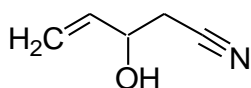
5.1.2.3. Metabonomikai elemzés

A kezelt állatok vizeletének NMR spektrumain a CHB mellett egy fő és két minor metabolit jelei jelentek meg (16. ábra). STOCSY elemzés segítségével a kémiai eltolódás értékek és a csatolási mintázat alapján a CHB-t és a fő metabolit, egy *N*-acetyl-ciszteinnel (NAC) konjugált telített származék szerkezetét tudtam azonosítani (17. és 18. ábra).

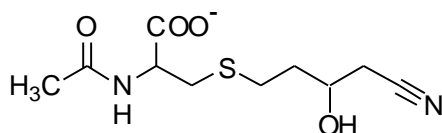


16. ábra. Kontroll (C), kis dózissal kezelt (LD) és nagy dózissal kezelt (HD) állatok reprezentatív normalizált 600 MHz ^1H NMR spektrumai 8 órával a modellanyag (CHB) beadása után. Normalizálás előtt törölt régiók: Víz/HDO ($\delta=4.7-4.9$), TSP ($\delta=-0.2-0.2$) és karbamid ($\delta=5.6-6$). Jelmagyarázat: CHB, 1-ciano-2-hidroxi-3-butén; 2-OG, 2-oxoglutársav; t-ac, *transz*-aconitsav; NACd, a CHB telített származékának *N*-acetyl-cisztein konjugátuma; mMs, a CHB minor metabolitjai, melyek csak a HD csoport mintáiban voltak láthatóak; cre, kreatin; crn, kreatinin;

A)

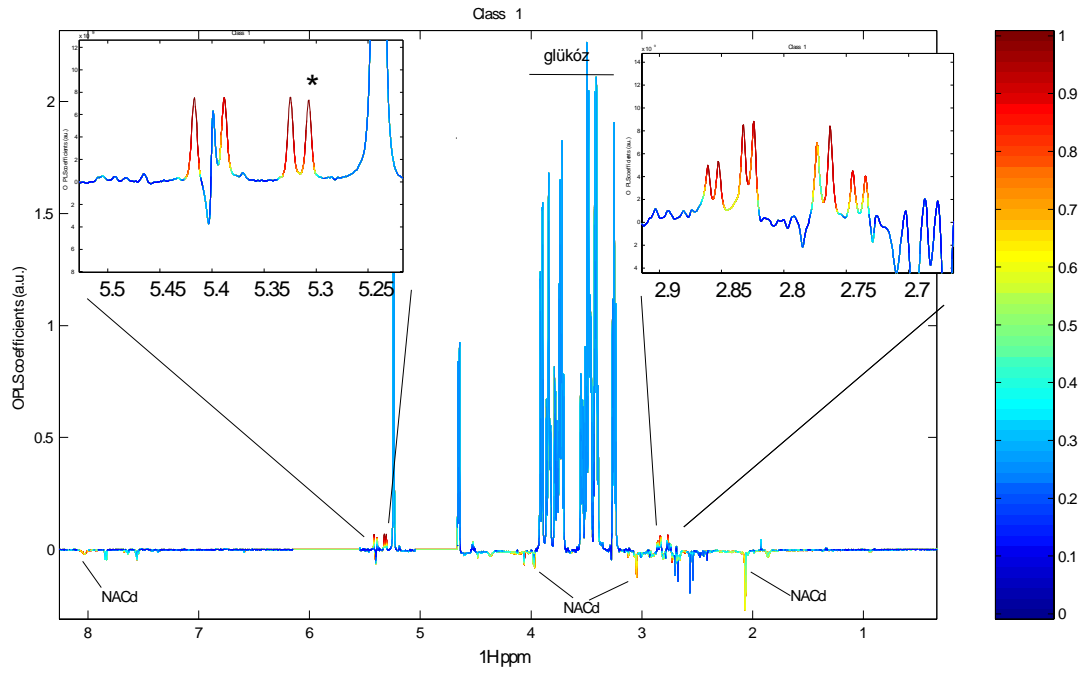


B)

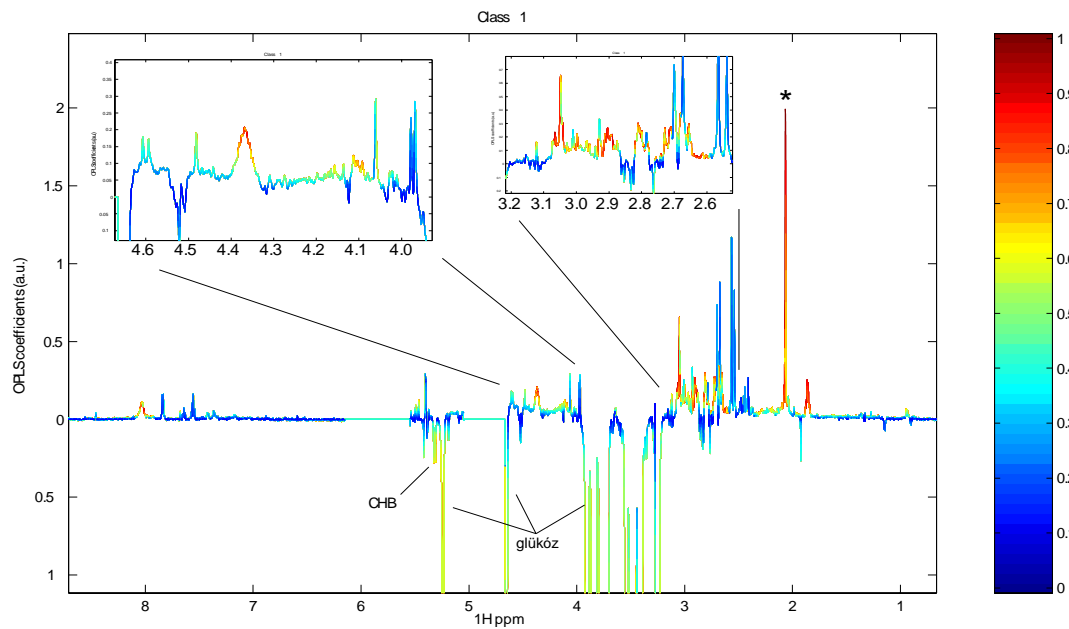


17. ábra Szerkezeti képletek. A) 1-ciano-2-hidroxi-3-butén (CHB), B) telített CHB származék *N*-acetyl-cisztein konjugátuma (2-(acetyl-amino)-3-[(4-ciano-3-hidroxi-butil)szulfanyl]propionát)

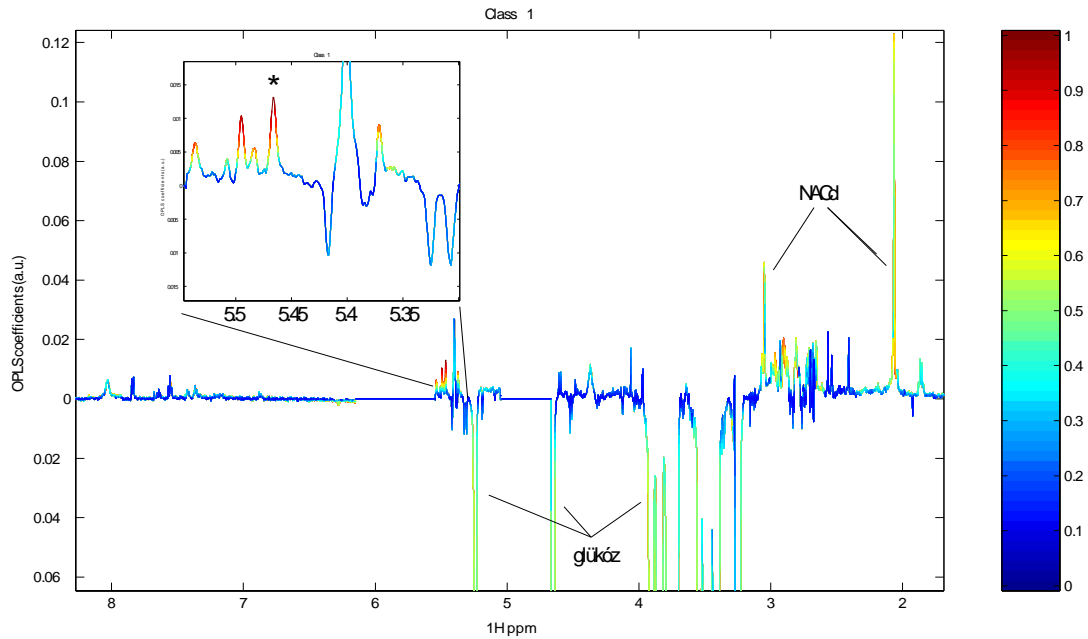
A)



B)



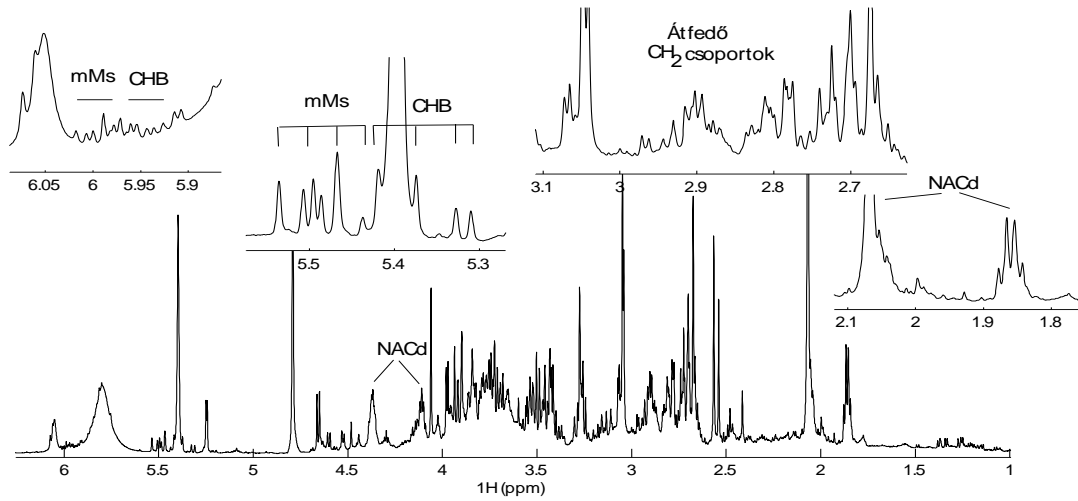
C)



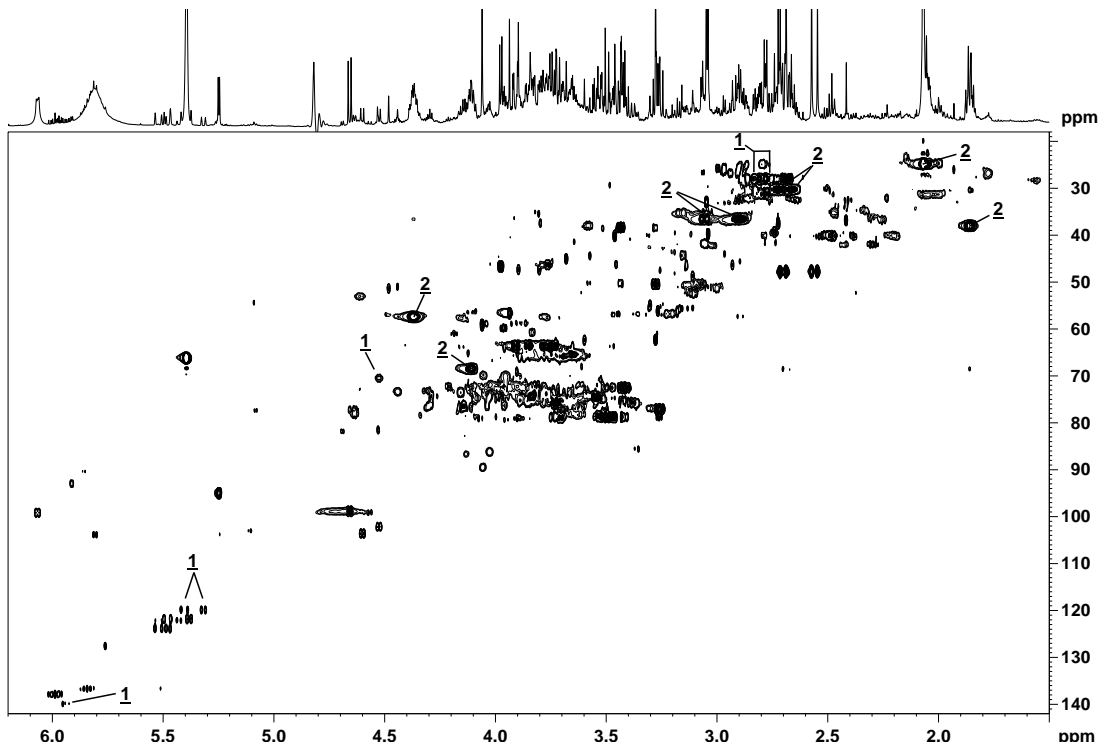
18. ábra. A nagy dózissal kezelt állatok ($n=10$) 8. órában gyűjtött vizeletmintáinak ^1H NMR spektrumai alapján készült 1D STOCYSY ábrák. Modelltoxin: CHB. A) Kiindulási csúcs az 1-ciano-2-hidroxi-3-butén (CHB) jele $\delta=5.32$ (*) B) Kiindulási csúcs a telített CHB származék *N*-acetyl-cisztein konjugátumának jele $\delta=2.07$ (*) C) Kiindulási csúcs minor metabolit jel $\delta=5.46$ (*). Normalizálás előtt törölt régiók: Víz/HDO ($\delta=4.7-4.9$), TSP ($\delta=-0.2-0.2$) és karbamid ($\delta=5.6-6$). Jelmagyarázat: CHB, 1-ciano-2-hidroxi-3-butén; NACd, a CHB telített származékának *N*-acetyl-cisztein konjugátuma

Az a jelhozzárendelést később kétdimenziós mérések is igazolták (19. ábra, 11. táblázat).

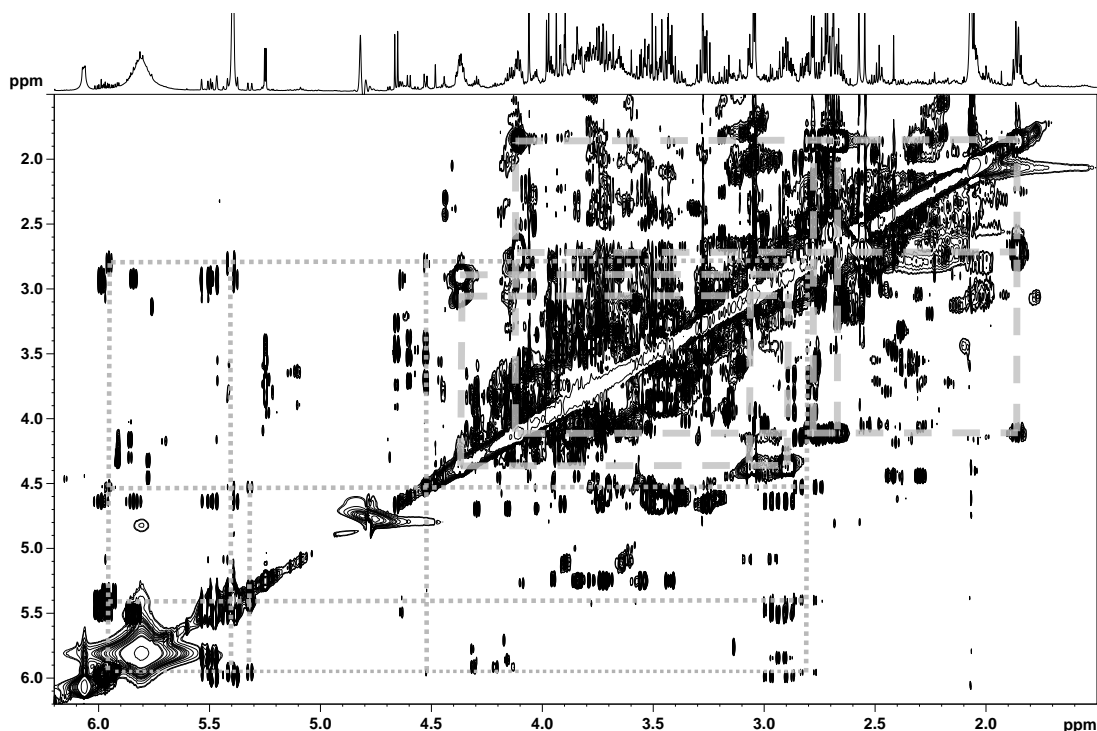
A)



B)



C)



19. ábra. Az egyik nagy dózissal kezelt állat 24. órában gyűjtött vizeletmintájának 1D és 2D NMR spektrumai. Modelltoxin: CHB. A) 1D ^1H NMR. Jelmagyarázat: CHB, 1-ciano-2-hidroxi-3-butén; NACd, a CHB telített származékának *N*-acetil-cisztein konjugátuma; mMs, a CHB minor metabolitjai. B) HSQC. Jelmagyarázat: 1, 1-ciano-2-hidroxi-3-butén; 2, a CHB telített származékának *N*-acetil-cisztein konjugátuma; C) TOCSY. Részletes jelhozzárendelés: 11. táblázat.

A nagy dózissal kezelt állatokban az anyavegyület koncentrációja 8 óránál volt a legmagasabb, és szintje pozitív korreláltságot mutatott a vizelet (egyébként meglehetősen nagy egyéni szórással bíró) glükózkoncentrációjával, mely arra utal, hogy a modelltoxin kis mértékben hatással lehet a hasnyálmirigy endokrin funkciójára is. A 8 h mintákban a glutation-konjugátumból származó *N*-acetil-ciszteinnel kapcsolt telített származék szintje ugyanakkor anti-korrelált volt a glükózzal (18. ábra). A HD csoportban mind a krambén, mind a major metabolit jelei megtalálhatók voltak a 24 h spektrumokban is, a telített NAC-konjugátum koncentrációja viszont itt már magasabb volt, mint a CHB-é. A kis dózissal kezelt állatoknál a két vegyület szintje csak 8 óránál haladta meg az NMR érzékenységet, és ezekben a mintákban a fő metabolit koncentrációja szintén magasabb volt, mint az anyavegyületé. A két további minor

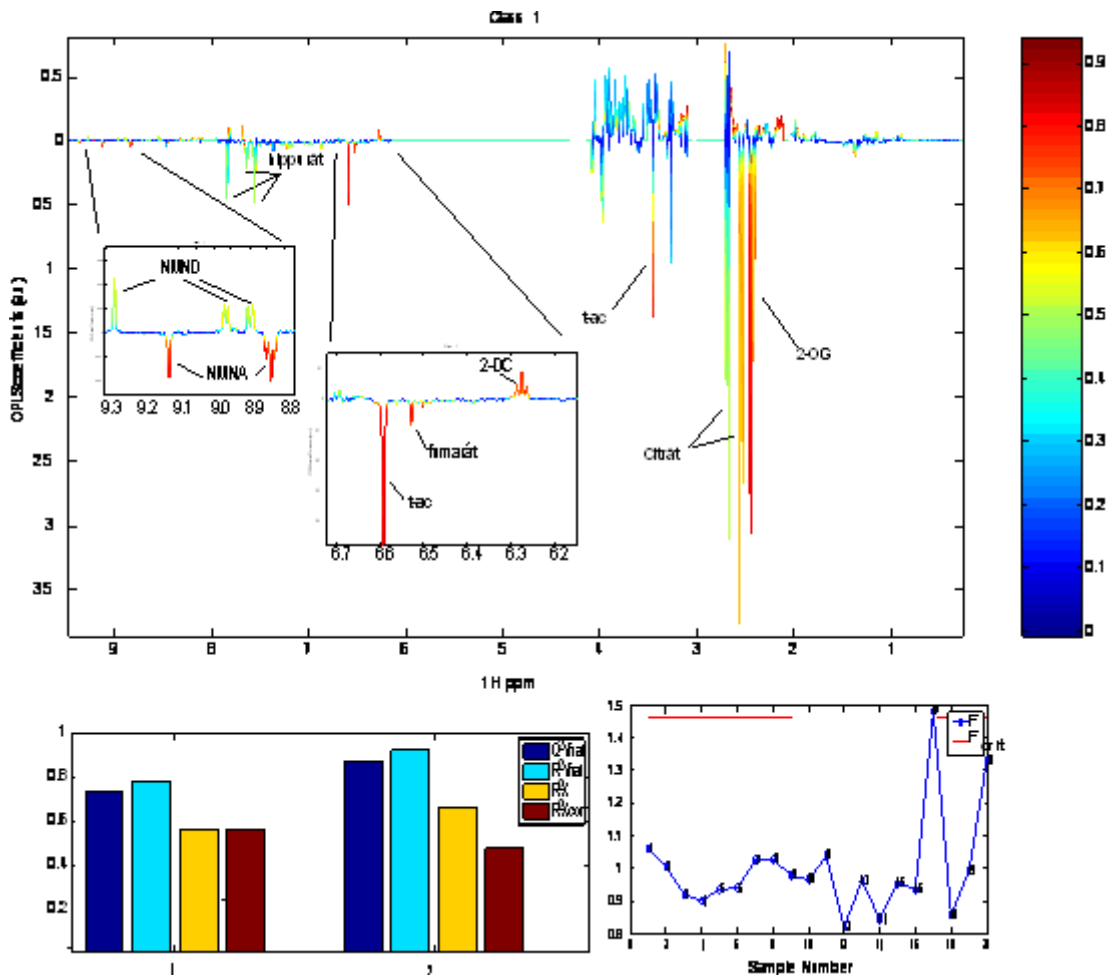
metabolit jeleit csak a nagy dózissal kezelt állatok 8 h és 24 h mintáiban lehetett látni. A szerkezetüket ugyan a spektrumok alapján nem sikerült egyértelműen felírni, a STOCSY elemzésből azonban annyi megállapítható, hogy vizeletbeli szintjük egymással is és (kisebb mértékben) a fő metabolittal is korreláltságot mutat (18. ábra).

Vegyület	¹ H kémiai eltolódás (δ ppm)	¹³ C kémiai eltolódás (δ ppm)
1-ciano-2-hidroxi-3-butén (CHB)		
CH₂ =(CH)	5,32 5,40	119,8
(CH ₂)= CH	5,95	139,8
CH -(OH)	4,53	70,4
CH₂ -(CN)	2,85 2,76	27,8
Telített CHB származék <i>N</i> -acetil-cisztein konjugátuma		
CH₃ -(C=O)	2,07	24,7
C=O	-	176,2
NH	8,05	-
CH -(COOH)	4,37	57,7
COOH	-	179,6
(CH)- CH₂ -(S)	2,905 3,05	36,4
(S)- CH₂ -(CH ₂)	2,66 2,73	30,1
(CH ₂)- CH₂ -(CH)	1,86	37,9
CH -(OH)	4,10	68,5
CH₂ -(CN)	2,69 2,79	30,1
CN	-	122,0

11. táblázat. Az 1-ciano-2-hidroxi-3-butén (CHB) és fő metabolitjának, a telített CHB származék *N*-acetil-cisztein konjugátumának (2-(acetilamino)-3-[(4-ciano-3-hidroxibutil)szulfanil]propionate) ¹H és ¹³C NMR kémiai eltolódás értékei. Szerkezeti képlet a 17. ábrán.

A kis dózissal kezelt állatok és a kontroll 8 órás vizeletmintáinak O-PLS-DA módszerrel történő összehasonlítása alapján az LD csoportban magasabb volt a 2'-deoxicitidin, a hangyasav, az *N*-metil-nikotinsavamid (NMND), az ecetsav és a borostyánkősav relatív koncentrációja, míg a citromsav, 2-oxoglutársav és hippursav szintje csökkent. Ezek a különbségek a következő időpont (24 h) spektrumain már nem

voltak láthatóak, és a későbbi időpontokban sem lehetett a vizelet kismolekula-összetételében a kontroll állatokhoz képest a csoportra jellemző eltérést találni. A nagy dózissal kezelt állatok vizeletspektrumai a klinikai kémiai eredményekkel összhangban 8 óránál magas glükóz szintet mutattak, mely a legtöbb állatnál már a 24 órás mintában a normális mennyiségre csökkent. A taurin, 2'-dezoxicitidin, és az NMND emelkedett mennyiségben volt a vizeletben a 8 h és a 24 h mintákban, a citromsav, a borostyánkősav, a hippursav, a fumársav, a *transz*-akonitsav és az *N*-metil-nikotinsav (NMNA) koncentrációja pedig csökkent a kontrollhoz képest a beadást követő első két időpontban (20. ábra).



20. ábra. A kontroll és a nagy dózissal kezelt (HD) csoportba tartozó állatok 24. órában gyűjtött vizeletmintáinak ^1H NMR spektrumai alapján készült O-PLS-DA együttható ábra. A felfelé mutató jelek metabolitjainak koncentrációja nőtt a HD állatok mintáiban, a lefele nézőké csökkent a kontrollhoz képest. A színskála a metabolit diszkriminatív súlyát jelzi. A két alsó ábrán a modell jóslóképességét mutató paraméterek és a keresztvalidálás eredménye látható. Normalizálás előtt törölt régiók: Víz/HDO ($\delta=4.7-4.9$), TSP ($\delta=-0.2-0.2$), karbamid ($\delta=5.6-6$), és a fő toxin-metabolit jelek. Modelltoxin: CHB. Jelmagyarázat: NMND, *N*-metil-nikotinamid; NMNA, *N*-metil-nikotinsav; 2-DC, 2'-dezoxicitidin; 2-OG, 2-oxoglutársav; t-ac, *transz*-akonitsav.

A felsorolt változások csoport szinten a 48 h mintákban már nem voltak láthatóak. A késői időpontokban a HD állatok vizeletmintáinak spektrumai mutattak kisebb egyéni eltéréseket egymástól és a kontrolltól, az alacsony mintaszám miatt azonban ezeket nem tudtam statisztikai módszerekkel értékelni. A szérumminták, valószínűleg a késői mintavételi időpontok miatt (48 h, 168 h) nem bizonyultak informatívnak, és a klinikai kémiai mérések eredményeihez képest nem szolgáltatottak további adatokat.

5.1.3. Ceruleinnel előidézett exokrin hasnyálmirigy-gyulladás

A rendelkezésre álló irodalmi források alapján [116-119] a COMET kísérlet tervezésénél az állatorvos az LD csoportnak egyszeri 50 µg/kg intraperitoneális cerulein adását rendelte, míg a HD csoport állatait egyórás intervallumokban 4-szer 50 µg/kg adaggal kezelték. A várakozással ellentétben az állatok mindkét dóziscsoportban gyakorlatilag tünetmentesek maradtak, a szövettani vizsgálat csak a nagy dózissal kezelt csoport 48. órából származó mintáin talált minimálistól közepes mértékűig terjedő multifokális acináris sejtnekrózist. A kezelt állatok testsúlygyarapodása megfelelt a kontroll állatokénak és klinikai kémiai adataik is csak sporadikusan, egy-egy esetben tértek el.

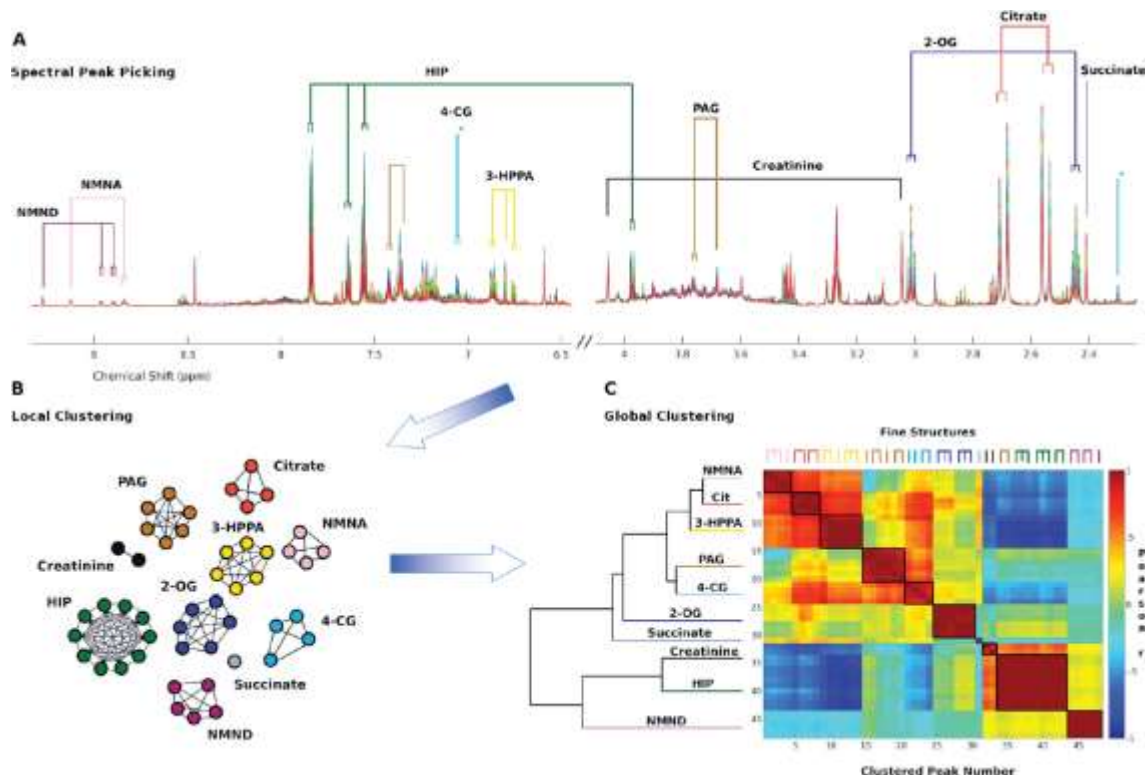
A mintákról készült NMR spektrumok és a kísérlethez tartozó összes egyéb adat rendelkezésre állt, így a hisztológiai és klinikai kémiai vizsgálatok nem túl biztató eredménye ellenére érdemesnek gondoltam megnézni, hogy legalább a szérum- és vizeletmintákban a kismolekulák szintjén láthatóak-e esetleg változások. Az értékelést a következő fejezetben ismertetett módszerrel végeztem, így az eredményét is ott mutatom be.

5.2. Klaszteranalízisen alapuló adatelemző módszer (CLASSY)

5.2.1. Klaszterezett korrelációk ábrája

A STOCYSY bemutatásánál (4.2.1.4. fejezet) már részleteztem, hogy a kísérletben gyűjtött spektrumok azon jelei között, melyek mind egy adott kismolekulától származnak a korrelációs koefficiens elméleti értéke 1, és a gyakorlatban is nagyon magas a zaj és a részleges átfedtség ellenére. A CLASSY elemzésnél ezek a

jelek alkotják a csoportba rendeződés első szintjén a „lokális” klasztereket, a klaszterezett korrelációk ábrájának diagonálisában megtalálható kisebb egységeket, blokkokat (21. ábra).



21. ábra. A CLASSY elemzés menetének sématis ábrája. A) Kontroll vizeletminták 600 MHz ^1H NMR spektrumai, tíz metabolit jeleinek feltüntetésével. B) „Lokális” klaszterek. A szerkezeti okokból korrelált jelcsúcsok egymástól jól elkülöníthető csoportokat alkotnak. A csoport méretét a metabolit NMR jeleinek száma és multiplicitása határozza meg. C) „Globális” klaszterek. Jelmagyarázat: HIP, hippursav; Cit, citromsav; NMNA, *N*-metil-nikotinsav; 2-OG, 2-oxoglutársav; Succinate, borostyánkősav; 4-CG, 4-krezol-glükuronid; 3-HPPA, 3-hidroxi-fenil-propionsav; Creatinine, kreatinin; NMND, *N*-metil-nikotinsavamid; PAG, fenil-acetil-glicin. Ábra: Steven Robinette.

A felbontás kellően nagy ahhoz, hogy a blokkok mérete tükrözze, hány jelet ad a molekula az NMR spektrumban, illetve, hogy a jelek milyen multiplicitásúak (v.ö. kreatinin és 3-HPPA, 21. ábra C), ezzel is segítve az elemzőt a kismolekula azonosításában. Nagyon szorosan ko-regulált metabolitok esetén természetesen előfordul, hogy a jelek nem válnak el tökéletesen, és egységes klaszterként jelennek meg. Erre példa az L-argininnel végzett kísérlet vonatkozó ábráján az arginin, ornitin és

lizin (22. ábra, A). Ha a kísérletbe több állatot vontak volna be, a szerkezeti és a biológiai korreláltság valószínűleg ezeknél a jeleknél is nyilvánvalóbban elvált volna.

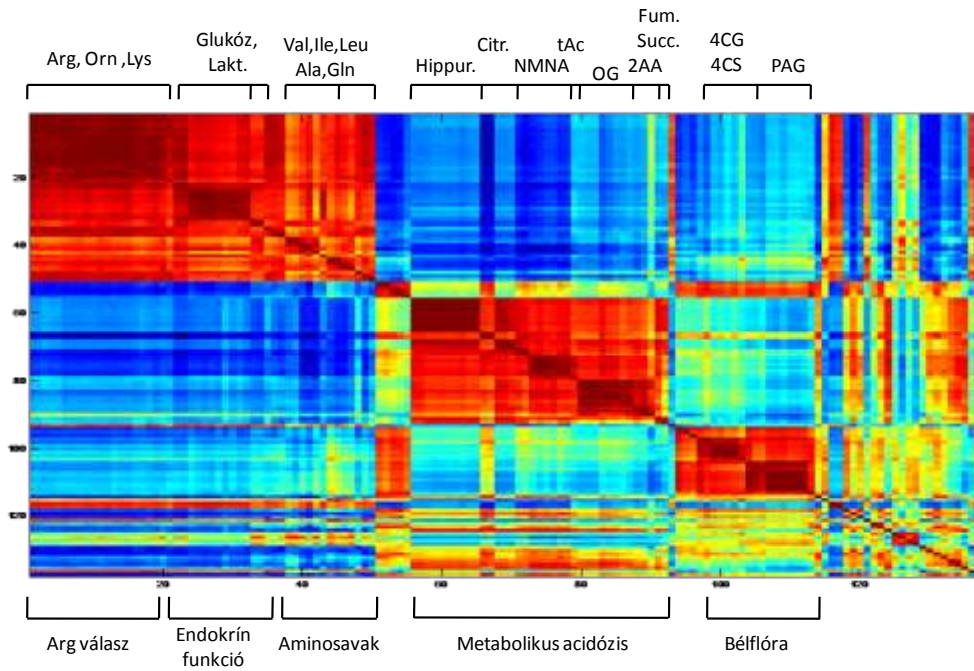
A csoportba rendeződés következő szintje, a „globális” klaszterek hordozzák a biokémiai információt: azok a kismolekulák alkotnak csoportokat, melyek koncentrációjának időbeli változása hasonló mintázatot mutat, így feltehetően hasonló biokémiai/fiziológias folyamatokban vesznek részt, szervezetbeli sorsuk összekapcsolódik (22. ábra, A, alsó felirat). Az argininnel végzett kísérletben a CLASSY elemzés öt fő csoportot tudott elkülöníteni: az arginin-terhelésre adott közvetlen válasz metabolitjai, az endokrin funkcióhoz köthető kismolekulák, az aminosav anyagcseréhez kapcsolódó molekulák, a szervezet sav-bázis egyensúlyának elbillenését indikáló kismolekulák, és a bélflóra működéséhez köthető metabolitok (22. ábra, A).

5.2.2. „Heat map” ábrák

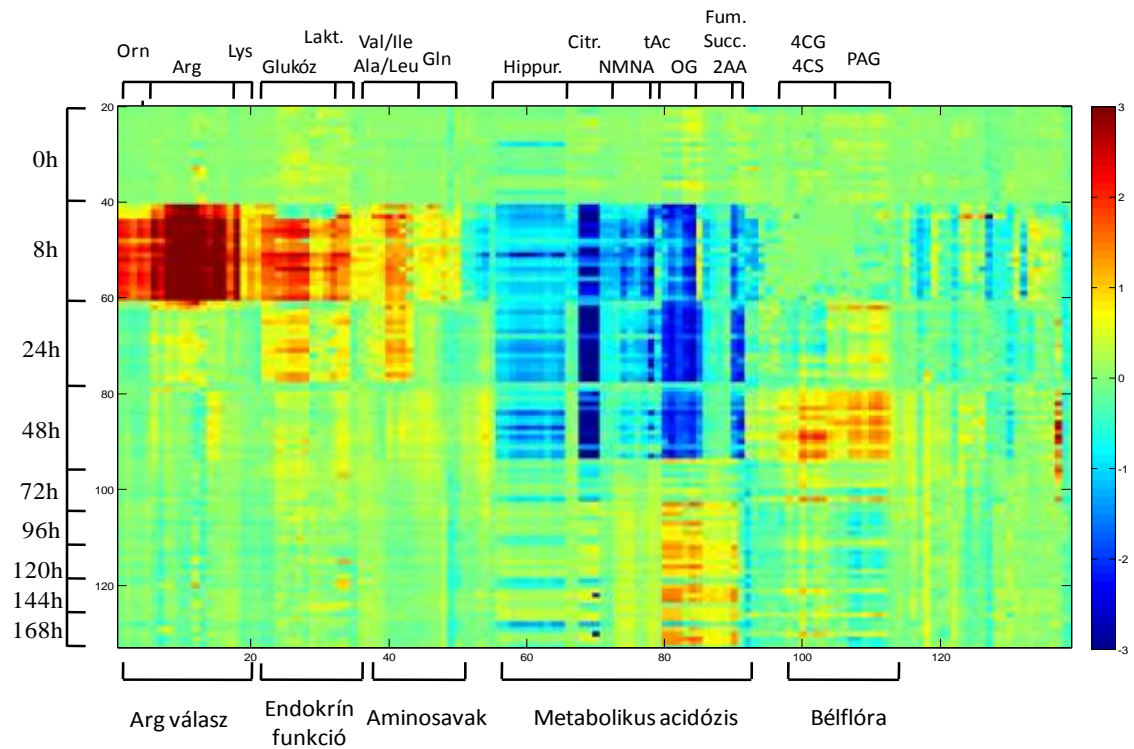
A „heat map” ábrákon (22. ábra, B) a vízszintes sorok az állatok egyedi mintái, azok NMR spektrumai időpontok szerinti bontásban, a függőleges oszlopok azonban megtartják a klaszterelemzés eredményét. A sorok így lényegében olyan NMR spektrumok, ahol a jeleket a kémiai eltolódás skálán elfoglalt eredeti helyükről a klaszteranalízis eredményének megfelelő új helyükre mozgattuk, hogy sorrendjük (a példaként vett kísérletben) a 22. A ábrának megfelelő legyen. A spektrális jelek intenzitását logaritmikus léptékű színskála segítségével ábrázoljuk: a piros árnyalatai mutatják, ha az adott jel intenzitása a kontroll mediánhoz képest nőtt, és a kéké, ha csökkent. A kísérlet szempontjából jelentőséggel bíró kismolekulák koncentrációjának időbeli változásai így egy adott dóziscsoport esetében egyetlen ábrán összefoglalva jelennek meg. A 22. B ábra részletes elemzése a 6.2.1. fejezetben olvasható.

A CLASSY-módszerrel nyert „heat map” ábráról az is közvetlenül leolvasható, ha a vizsgált állatok köre a válaszadás szempontjából nem egységes, hanem alcsoportokra bontható. Az arginin hatásával szemben rezisztenciát mutató állatok metabolikus profilja egységes, de a csoport többi tagjától eltérő (22. ábra, C).

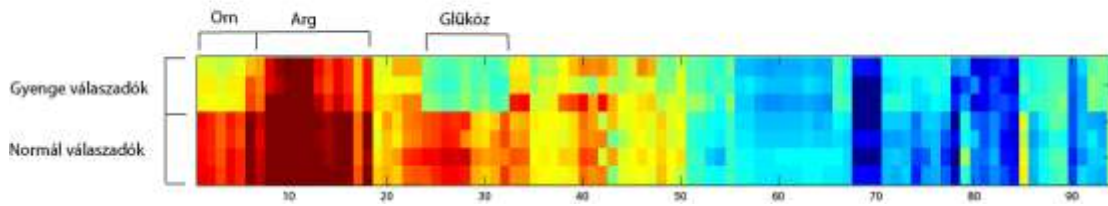
A)



B)

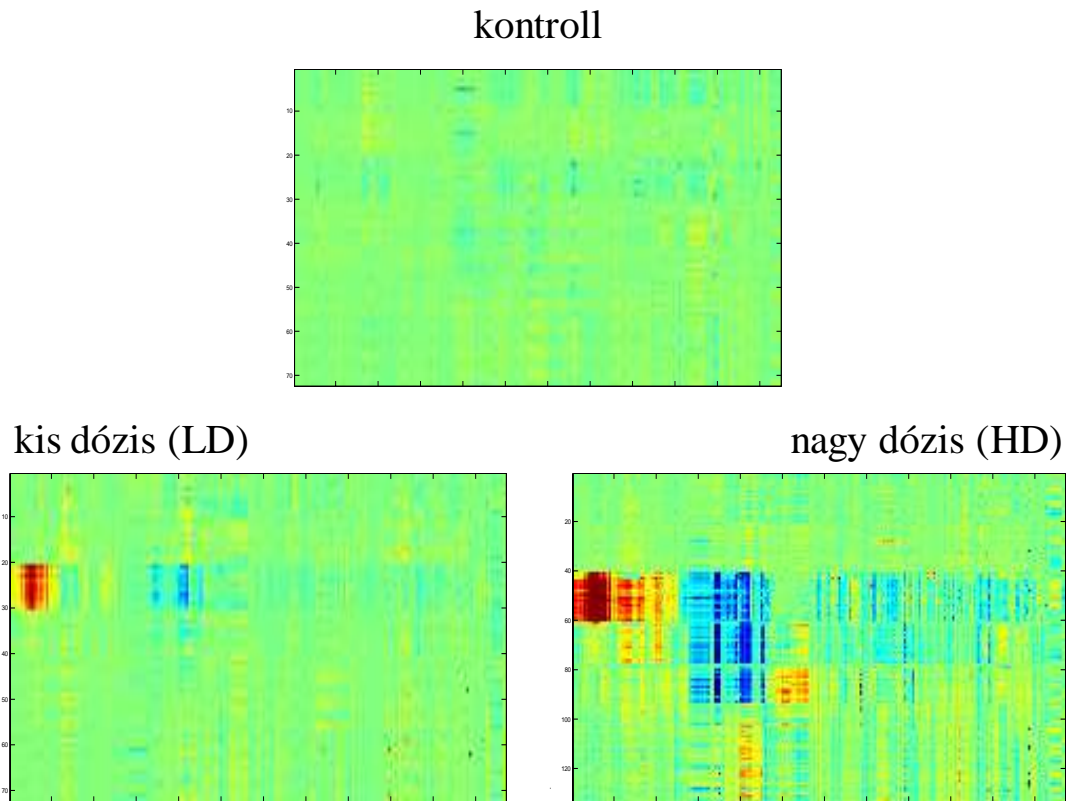


C)



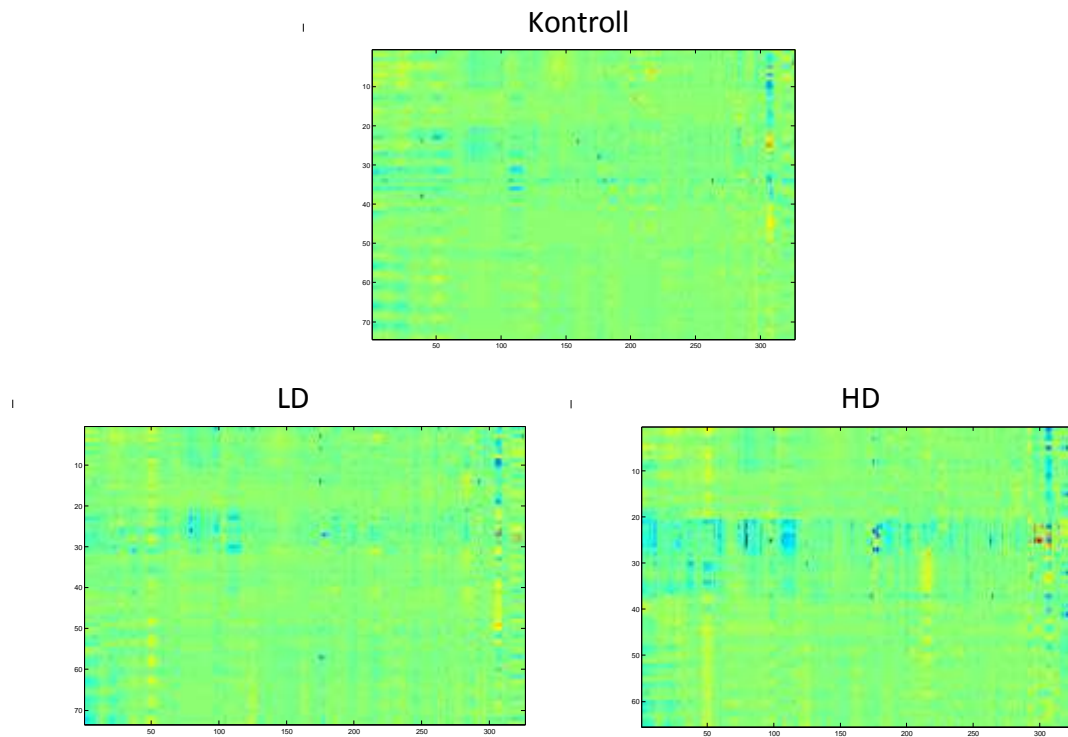
22. ábra. Az L-argininnel végzett kísérlet vizeletmintáinak 600 MHz ^1H NMR spektrumai alapján készült CLASSY ábrák részletei. A) Klaszterezett korrelációk ábrája. Az ábra felett a szerkezeti okokból korrelált jelcsoportok hozzárendelése olvasható („lokális klaszterek”), az ábra alatt pedig a feltételezett élettani/biokémiai kapcsolat („globális klaszterek”). B) A nagy dózissal kezelt csoport „heat map” ábrája. A vízszintes sorok az állatok egyedi mintáinak NMR spektrumai időpontok szerinti bontásban. A függőleges oszlopok megegyeznek az A) ábra oszlopaival. A spektrális jelek kontroll mediánhoz viszonyított intenzitását logaritmusos léptékű színskála mutatja. C) A B) ábra 8 h mintákat mutató részének kinagyított részlete. A *gyenge* és *normál válaszadók* vizeletmintái között lényeges különbség mutatkozik az ürített glükóz és ornitin mennyiségében. Jelmagyarázat: Arg, arginin; Orn, ornitin; Lys, lizin; Lakt., tejsav; Val, valin; Leu; leucin; Ile, izoleucin; Ala, alanin; Gln, glutamin; Hippur., hippursav; Citr., citromsav; NMNA, *N*-metil-nikotinsav; tAc, *transz*-akonitsav; OG, 2-oxoglutársav, Fum., fumársav; Succ., borostyánkősav; 2AA, 2-amino-adipinsav; 4CG, 4-krezol-glükuronid; 4CS, 4-krezol-szulfát; PAG, fenil-acetil-glicin. Megjegyzés: Annak érdekében, hogy az ábrák a nyomtatott dolgozat méretei mellett is arányosak és áttekinthetőek maradjanak, a glükóz jelek egy részét a spektrumokból kivágtam.

További eredmény, hogy az adott kísérlethez tartozó három dóziscsoport „heat map” ábrájának együttes vizsgálatával könnyen ellenőrizhető a kontroll megbízhatósága és a biológiai válaszok dóziszfüggése (23. ábra – részletes elemzés 6.2.1. fejezet).



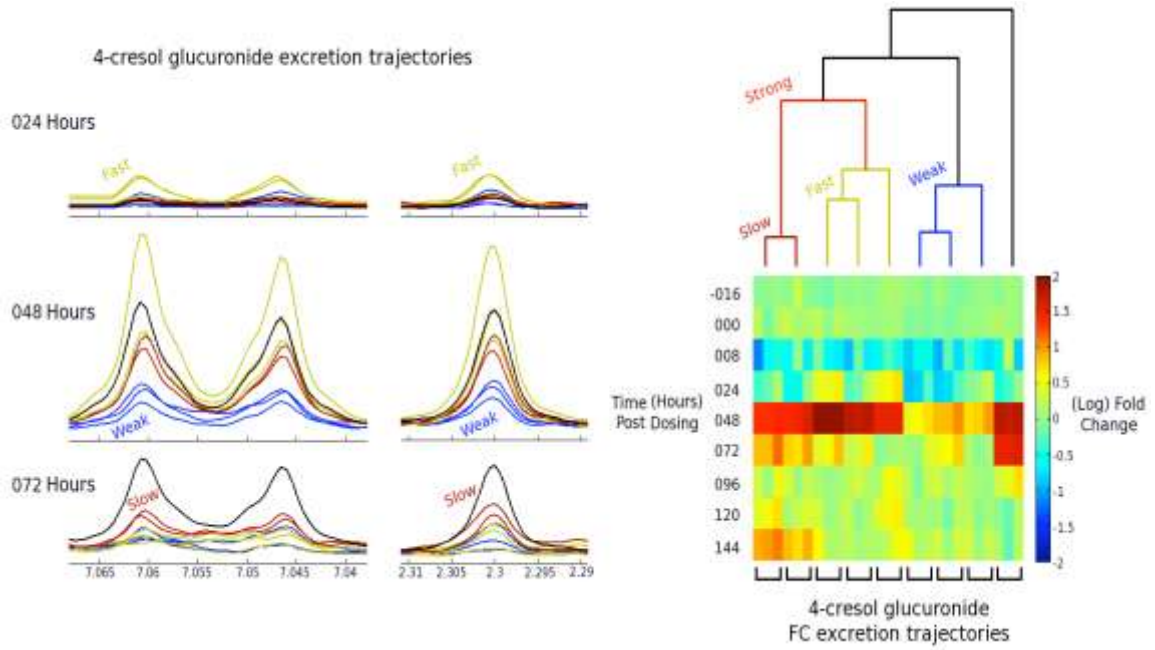
23. ábra. Az L-argininnel végzett kísérlet vizeletmintáinak “heat map” ábrái dóziscsoportok szerinti bontásban. Megjegyzés: Annak érdekében, hogy az ábrák a nyomtatott dolgozat méretei mellett is arányosak és áttekinthetőek maradjanak, a glükóz jelek egy részét a spektrumokból kivágtam.

A COMET kísérletsorozat harmadik exokrin hasnyálmirigy-gyulladást előidéző modelltoxinja, a cerulein esetében a szövettani és klinikai kémiai vizsgálatok arra utaltak, hogy a kívánt mértékű toxikus hatást ebben a kísérletben nem sikerült elérni. Ez azonban nem feltétlenül jelenti azt, hogy a kismolekulák szintjén sem várható érdemi változás. A három dóziscsoport vizeletmintái alapján készült „heat map” ábrák (24. ábra) azonban sajnos első pillantásra egyértelművé tették, hogy nem érdemes a spektrumok elemzésére több időt fordítani (vö. L-argininnel végzett kísérlet, 23. ábra)



24. ábra. A ceruleinnel végzett kísérlet “heat map” ábrái a kontroll, a kis dózissal kezelt (LD) és a nagy dózissal kezelt (HD) állatok csoportjaira.

Az arginninnel végzett kísérlethez és a 22. ábrához visszatérve szembevető lehet még a krezol és a PAG metabolitok vizeletbeli szintjének nagy egyéni szórása. Ha a krezol-glükuronid jeleire koncentrálva az ábrát kissé átrendezzük, és az egyének közötti hasonlóságot vesszük alapul a klaszterezéshez, akkor a bélflóra reakciója szempontjából *erős és gyenge válaszadókat* és emellett *gyors és lassú válaszadókat* is el tudunk különíteni (25. ábra).



25. ábra. A krezol-metabolitok jeleinek mintázatából kiderül, hogy nemcsak a válaszadás erősségében vannak különbségek az állatok között (*erős és gyenge válaszadók*), hanem időzítésében is (*gyors és lassú válaszadók*). Ábra: Steve Robinette.

6. Megbeszélés

6.1. Exokrin hasnyálmirigy-gyulladást előidéző modelltoxinok

6.1.1. L-argininnel előidézett exokrin hasnyálmirigy-gyulladás

Az L-arginin egy endogén kismolekula, melynek a kationos aminosavak aktív transzportrendszere majdnem tökéletes felszívódást biztosít orális adagolásnál, és a metabolizmusa már az enterocitákban megkezdődik. Még extrém nagy dózisok orális adása esetén sem ismertek mellékhatások. Fiziológias körülmények között a vesének kevés szerep jut az arginin kiürítésében, mivel az aminosav reabszorbeálódik a proximális tubulusban és a Henle-kacs leszálló ágában [136]. Más a helyzet azonban, ha a szokványostól eltérő, intraperitoneális úton jut nagy dózisban a szervezetbe. Ekkor xenobiotikumokra jellemző toxikus hatást vált ki.

Kísérletünkben az intraperitoneális arginin injekcióra bekövetkező kismolekula-összetételbeli változásokat korreláltságuk mértéke és időbeli lefolyásuk alapján több csoportra lehetett osztani: a) a nagy mennyiségű arginin megjelenésére adott közvetlen válasz, b) az ezzel párhuzamosan kialakuló metabolikus acidózis és következményei, c) az aminosav anyagcsere átmeneti zavara, d) az endokrin funkció átmeneti zavara, e) a bélflóra reakciója, f) a szervezet hosszútávú alkalmazkodása a csökkent hasnyálmirigy-működéshez.

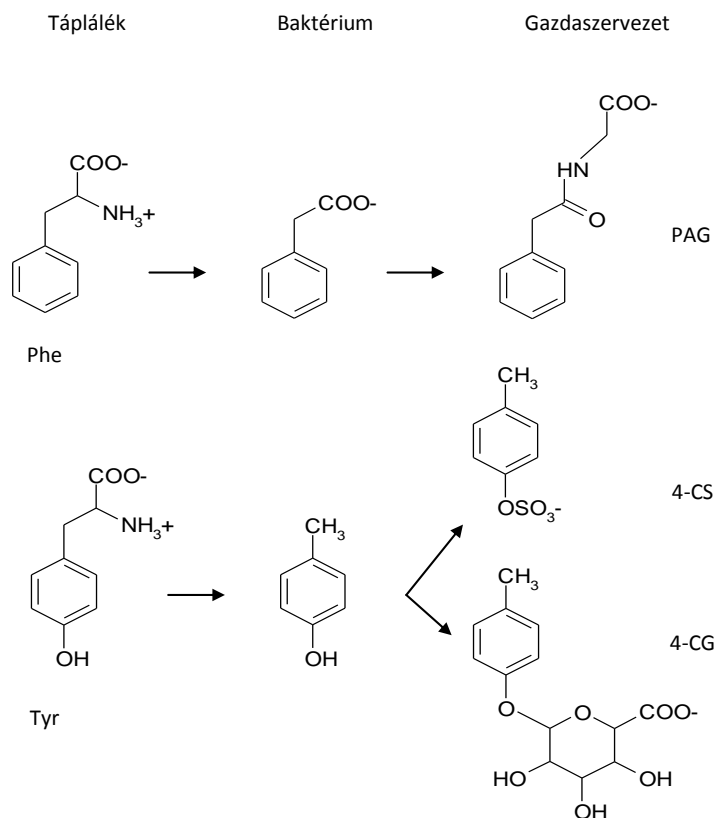
A nagy mennyiségű arginin megjelenésére adott azonnali válaszoknak a legvalószínűbb mozgatórugója a nitrogénháztartás egyensúlyának fenntartása és a toxikus ammónia minél gyorsabb eliminálása. A kísérlet érdekessége, hogy pont az aminosav okozza a zavart ebben az alapvető fontosságú biokémiai funkcióban, amelynek fiziológias körülmények között is kulcsszerepe van a folyamatokban. Mindkét dóziscsoportban az arginin egy része változatlan formában ürült a vizelettel. Közvetlenül a beadás után észlelhető volt ugyanakkor, hogy az urea-ciklus és a transzaminálási folyamatok aktivitása a dózistól függő mértékben megemelkedett (ld. vizelet ornitin, glutamin és glutaminsav szintje, szérum urea nitrogén). Az aktivitás fokozódás a HD állatokban elérte maximumát, így azok a metabolizálatlan arginint

dózisuk arányánál nagyobb arányban ürítették. A kis dózissal kezelt állatok rövid időn belül elhárították a túlzott mennyiségű arginin lebontásából származó ammónia terhelés veszélyét, és homeosztázisuk 24 órán belül helyreállt. A HD csoportba tartozó állatok szervezetének ugyanakkor nemcsak a nagyobb mennyiségű argininből származó ammóniával kellett szembenéznie, de az időközben károsodott hasnyálmirigy-szövetek fehérjéinek lebontásából érkező aminosavak nitrogéntartalmával is. Ezeket a potenciális további ammónia-forrásokat az állatok végül átalakítás helyett inkább közvetlenül ürítették a vizelettel (ld. vizelet valin, leucin, izoleucin, alanin és fehérje szintje). Az arginin beadását a HD csoport állataiban a vizelet glükózkoncentrációjának növekedése is kísérte. A jelenség Sprague-Dawley patkányokat alkalmazó toxicitás vizsgálatokban nem ritka, itt mégis valószínűbb, hogy a cukorszint és a tejsavsavszint emelkedése a hasnyálmirigy enyhe és átmeneti endokrin funkcióbeli zavarának következménye.

Az intraperitoneálisan adott L-arginin-hidroklorid másik, azonnal jelentkező hatása a dóziszfüggő mértékű acidózis kialakulása volt. A COMET kísérletekben az általános előíratnak megfelelően a vizelet pH-ját minden mintánál megmérték, így az acidózis kialakulása és a regenerálódás lassú folyamata jól követhető ezeknek az értékeknek az ábrázolásával (8. ábra). A pH meghatározása ugyanakkor nem minden toxikológiai mérés rutinszerűen elvégzett vizsgálati pontja. Az NMR spektroszkópián alapuló metabonomikai méréseknél a minta pH-jának normálistól való eltérése a spektrumon is tükröződik azon jelek kémiai eltolódásának elmozdulásában, ahol a kismolekula protonáltsági állapota az adott mag körüli elektronsűrűsége hatással van (pl. citromsav, kreatinin). A kémiai eltolódás változása ugyan nemcsak az eltérő pH-nak lehet következménye, hanem pl. ionerősség-változásnak, vagy komplexképzésnek is, mégis, ha más adat nem áll rendelkezésre, egy közelítő becslés az eltolódás értékek alapján is megengedhető. A lehetőségeket némiképp szűkíti, ha a minta pH-ja szélsőségesen savas, ilyenkor ugyanis azoknak a kismolekuláknak a jelei, melyek vizeletbeli ürítése pH-függő, teljesen hiányozhatnak a spektrumokból. Erre látunk példát ebben a kísérletben a nagy dózissal kezelt csoport 8-48 h mintáinál (10. ábra). A hiányzó jelek leginkább a citrátkör kismolekuláihoz tartoznak (2-oxoglutársav, citromsav, fumársav, borostyánkősav), ami azért sajnálatos, mert az arginin injekció közvetlen biokémiai hatása ezekre a központi szerepet betöltő metabolitokra a kísérlet korai időpontjaiban nem vizsgálható.

A klinikai kémiai mérések eredményei a HD csoport állatainál a késői időpontokban a hasnyálmirigy csökkent működésének következményét mutatják: alacsony szérum fehérje és albumin szint, alacsony vizelet protein szint. A citrátkör intermedierek koncentrációja ugyanakkor ezekben a spektrumokban a kontroll állatokhoz képest magasabb volt, annak ellenére, hogy a HD csoport vizeletének pH-ja még mindig az enyhén savas tartományban maradt. Ilyen „overshoot” jelenséggel gyakran lehet találkozni biokémiai vizsgálatokban, itt azonban az állatok súlygyarapodása és a szövettani vizsgálatok alapján valószínűbb, hogy a szervezet az energiaháztartás egyensúlyát igyekezett új alapokra helyezni.

Kísérletünk talán egyik legérdekesebb megfigyelése a bélflóra összetételéhez és működéséhez köthető kismolekulák arányának megváltozása a nagy dózissal kezelt állatokban. A növényi polifenolok, klorogénsav lebontási termékeként keletkező hippursav és 3- ill. 4-hidroxi-fenil-propionsav (HPPA) [137] vizeletbeli koncentrációi a kísérlet első részében alacsonyabbak voltak a HD csoportban, mint a kontrollnál, és több állat esetén a késői időpontokban sem tértek vissza a kiindulási értékre. A fenil-acetil-glicin (PAG), 4-krezol-szulfát (4-CS) és 4-krezol-glükuronid (4-CG) koncentrációja ellenben jelentősen megemelkedett a 24. és 72. óra közötti mintákban. A fenil-acetil-glicin a vastagbél baktériumainak fenil-alanin lebontásából származik. Első lépésben fenil-ecetsav (PA) képződik, melyet felszívódás után a gazdaszervezet glicinnel konjugál és a vesén keresztül kiürít (26. ábra). A krezol forrása a bakteriális tirozin-bontás. A felszívódó neurotoxikus metabolitot a máj szulfáthoz vagy glükuronidhoz kapcsolja, és ebben a formában eliminálódik a vizelettel [138,139] (26. ábra). A PA és a krezol nagy mértékű termelődését elsősorban egyes baktérium törzsek, pl. Bacteroid, Clostridium és Escherichia coli fajok jelenléte esetén figyelték meg [139,140]. Kísérletünkben tehát a hasnyálmirigy-károsodás és annak következtében kialakuló elégtelen emésztés átrendeződéshez vezetett a bélflóra összetételben, ahol átmenetileg teret nyertek potenciálisan káros, toxintermelő törzsek is.



26. ábra. A vizelet fenil-acetil-glicin (PAG), 4-krezol-glükuronid (4-CG) és 4-krezol-szulfát (4-CS) tartalmának forrása.

A humán exokrin pancreatitis leggyakoribb késői szövődménye a hasnyálmirigy elfertőződése, és ennek következtében kialakuló általános szepszis, mely halálhoz vezethet. A fertőzést a bélflóra baktériumainak transzlokációja okozza. Felvetődik tehát a kérdés, hogy megfigyelhető-e hasonló változás a bélflóra összetételében, működésében humán esetekben is, ez korrelációba hozható-e a késői szövődmény kialakulásának gyakoriságával, valamint hogy a vizelet kismolekula-összetételének mérése alkalmas lehet-e arra, hogy a beteg veszélyeztetett állapotát előre jelezze. Hazai és külföldi kutatócsoportok már klinikai vizsgálatokkal is igazolták, hogy az enterális táplálás a bélfal integritásának fenntartásán és a bakteriális transzlokáció gátlásán keresztül előnyt jelent a parenterális táplálással szemben, és az így kezelt betegeknél csökken a szepszis szövődmények, műtéti beavatkozások száma, a mortalitás és a kezelés időtartama [141,142]. Annak vizsgálatára is folytak állatkísérletek, hogy probiotikumok adásával, vagy specifikus, célzott antibiotikum-terápiával csökkenthető-e a pankreasz elfertőződésének valószínűsége [143-145]. A kísérletek biztató

eredménnyel jártak, így a vizsgálatot kiterjesztették humán esetekre is. 296 súlyos hasnyálmirigy-gyulladásban szenvedő beteg bevonásával Hollandiában végeztek humán klinikai vizsgálatot annak megállapítására, hogy probiotikumok adása előnyt jelent-e a hagyományos terápiával szemben [146]. A dupla-vak alapon végzett vizsgálat 2008. februárjában zárult le, de nem a remélt eredményt hozta. A probiotikumokkal kezelt csoportban a halálozási arányt szignifikánsan magasabbnak találták, mint a hagyományos terápiában részesülőknél. A szakmai fórumok a kísérlet tanulságaként a probiotikumok adását pancreatitis és egyéb súlyos gasztrointesztinális megbetegedések esetén azonnal ellenjavalltnak minősítették.

A vizsgálat alatt a betegektől 214 db vizeletmintát gyűjtöttek, és ezeket $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tárolták további elemzések céljából. A minták metabolit-összetételének NMR-es vizsgálatát 2009. februárjában végeztük a londoni Imperial College NMR-laboratóriumában. A 214 mintából 156 minta NMR spektrumában paracetamol-metabolitok jeleit találtam. Az esetek egyharmadában a metabolitok aránya azonban a 4.1.1.4. fejezetben leírt jegyeket mutatta: lecsökkent vagy teljesen hiányzott a paracetamol-glükuronid metabolit, megemelkedett a metabolizálatlan paracetamol és az ecetsav szintje. A mintákhoz a gyűjtéskor nem adtak nátrium-azidot. 20 reprezentatív mintát kiválasztottam qPCR elemzéshez, és a vizsgálat egyértelműen igazolta bakteriális DNS jelenlétét emelkedett mennyiségben. Mindezek ismeretében sajnos a mintákat metabonomikai vizsgálat céljára alkalmatlannak kellett minősíteni.

6.1.2. 1-ciano-2-hidroxi-3-buténnel előidézett exokrin hasnyálmirigy-gyulladás

Korábbi metabonomikai vizsgálatok már igazolták, hogy az éhezés, táplálékmegvonás jellegzetes módon megváltoztatja a vizelet metabolit-profilját [79]. A nagy dózissal kezelt állatok jelentős mértékű súlyvesztése miatt ebben a kísérletben számolni kell azzal, hogy a kismolekula-összetétel változása részben az injekciót követő kezdeti étvágytalanság, majd az elégtelen emésztés következménye lehet. A citrátkör intermedierek (citromsav, 2-oxoglutársav, borostyánkősav, fumársav), a *transz*-akonitsav és az NMNA szintjében megfigyelhető csökkenés ezért nem tekinthető specifikus markereknek. A hatásmechanizmus megértése szempontjából ugyanakkor jelentősége lehet a 2'-dezoxicitidin korai időpontokban (8 h és 24 h), mindkét dóziscsoportban látható konzisztens emelkedésének. A 2'-dezoxicitidin fiziológiásan is

NMR érzékenységet meghaladó mennyiségben van jelen a Sprague-Dawley patkányok vizeletében, köszönhetően a máj alacsony nukleozid aminoszénhidroláz aktivitásának [147]. A metabolit emelkedett koncentrációját ugyanakkor akut hasnyálmirigy-gyulladásban még nem figyelték meg, így itt ez a CHB-toxicitásra jellemző, specifikus markernek tekinthető. Az argininnel előidézett hasnyálmirigy-gyulladástól eltérő mechanizmusra utal az is, hogy annál a modellenél markáns és időben jól körülhatárolható változásokat tapasztaltunk azoknak a kismolekuláknak a vizeletbeli koncentrációjában, melyek az emlős szervezet és a vele szimbiózisban élő bélbaktériumok közös anyagcsere termékei. A krabban okozta akut pancreatitis modellben ilyen nem volt látható, és ez arra enged következtetni, hogy itt a kísérleti állatok bélflórájának összetétele és működése alapján véve zavartalan maradt.

Az irodalmi forrásokban a CHB metabolizmusára nem találtam utalást. A kísérletben gyűjtött vizeletminták alapján megállapítható, hogy az anyavegyület mindkét dóziscsoportnál változatlan formában is ürül, ám fő metabolitja egy N-acetil-ciszteinnel kapcsolt származék. A nagy dózissal kezelt állatok vizeletében az előbbieknél lényegesen alacsonyabb koncentrációban két további metabolit jelei is megfigyelhetők. Ezek szerkezetének megállapítása elválasztástechnikával kapcsolt NMR/MS mérést igényel.

6.1.3. Ceruleinnel előidézett exokrin hasnyálmirigy-gyulladás

A rendelkezésre álló irodalmi források alapján a COMET kísérlet tervezésénél az állatorvos az LD csoportnak egyszeri 50 µg/kg intraperitoneális cerulein adását rendelte, míg a HD csoport állatait egyórás intervallumokban 4-szer 50 µg/kg adaggal kezelték. Az állatok mindkét dóziscsoportban gyakorlatilag tünetmentesek maradtak, a szövettani vizsgálat csak a nagy dózissal kezelt csoport 48. órából származó mintáin talált minimálistól közepes mértékűig terjedő multifokális acináris sejtnekrózist. A kezelt állatok testsúlygyarapodása megfelelt a kontroll állatokénak és klinikai kémiai adataik is csak sporadikusan, egy-egy esetben tértek el. A metabolomikai elemzés nem derített fel érdemi eltéréseket a kontroll és a kezelt állatok vizeletének összetétele között a vizsgálat teljes, egy hetes időtartama alatt.

Markáns szövettani/morfológiai elváltozásokat okozó toxikus hatás esetén is előfordulhat, hogy a kismolekulák szintjén az adott kísérletben rendkívül csekély

változást tapasztal az elemző. Az ilyen kísérletek jellemzően nem kapnak publicitást és „sikertelennek” minősülnek, holott értékes tanulságokat lehetne levonni belőlük, és elkerülhetővé válna, hogy más kutatócsoportok hasonló ötletektől vezérelve megismételjék a méréseket. Az egyik legfontosabb általános tanulság, mely a metabonomikával újonnan ismerkedő kutatók számára a nagyszámú sikeres kísérletről beszámoló publikáció fényében talán nem nyilvánvaló, hogy tehát ez a kutatási módszer sem „mindenható”, a kísérlet sikere itt sem garantált. A ceruleinnel végzett COMET mérésnél ugyanakkor nemcsak a metabonomikai eredmények maradtak el, de a szövettani, klinikai kémiai vizsgálat is arra utalt, hogy itt a kívánt toxikus hatást nem sikerült elérni. Ennek legvalószínűbb oka a dózis megválasztása. A COMET kísérletek óta eltelt időben a Sprague-Dawley patkányokon ceruleinnel végzett vizsgálatoknál az állatok jellemzően 7-szer 50 µg/kg modellanyagot kapnak [148,149].

6.2. Klaszteranalízisen alapuló adatelemző módszer (CLASSY)

6.2.1. Klaszterezett korrelációk ábrája

A klaszterezett korrelációk ábrája lehetővé teszi, hogy könnyen és gyorsan szűrjük a kísérlet szempontjából fontos, változásokat mutató kismolekulák körét. (22. ábra, A). A „lokális” klaszterekben minden pixelhez (NMR jelcsúchhoz) egy négy tizedes pontosságú kémiai eltolódás érték tartozik, így az elemző az egy blokkba rendeződő, összetartozó csúcsok alapján jó eséllyel azonosítani tudja a kismolekulát. A rendszert olyan adatbázishoz kötve, mely metabolitok kémiai eltolódás értékeit és multiplicitását tartalmazza, az azonosítás automatikussá is tehető.

A csoportba rendeződés következő szintje, a „globális” klaszterek hordozzák a biokémiai információt: azok a kismolekulák alkotnak csoportokat, melyek koncentrációjának időbeli változása hasonló mintázatot mutat, így feltehetően hasonló biokémiai/fiziológias folyamatokban vesznek részt, szervezetbeli sorsuk összekapcsolódik (22. ábra, A). Bár a módszer ezen a ponton nyilvánvalóan nem tévedhetetlen, a kismolekulák csoportosítása nagyban segíti az elemzőt abban, hogy a párhuzamosan zajló folyamatok biológiai értelmezést megtalálja.

6.2.2. „Heat map” ábrák

Az L-argininnel végzett kísérletben a HD csoportba tartozó állatok ($n=20$) vizeletmintáinak „heat map” ábrája alapján levonható következtetések megfelelnek a korábbi, O-PLS-DA és STOCYSY módszerrel végzett elemzés eredményének, így azokat most csak röviden, az ábra értelmezésének segítségével foglalom össze (22. ábra, B). A beadás időpontjában az állatok metabolikus profilja a kontroll állatokéval egyezést mutat (0 h: zöld sáv). A nagy mennyiségű arginin megjelenése a szervezetben az urea cikluson keresztül közvetlen hatással volt az ornitin vizeletbeli mennyiségére és közvetetten zavart okozott az aminosav anyagcserében (első és harmadik „globális” klaszter). Az utóbbi lassabban, 24 óra után regenerálódott, hasonlóképpen a vizelet emelkedett glukóz és tejsav szintjéhez (második klaszter). Az elemzés robusztusságát mutatja, hogy annak ellenére, hogy az endokrin funkcióban és az aminosav anyagcserében beálló változások nagyon hasonló időbeli lefolyást mutatnak, a két klaszter metabolitjai mégsem keveredtek össze. Azok a kismolekulák, melyek vizeletbeli koncentrációja pH-függő, és a kialakuló metabolikus acidózis következtében mennyiségük lecsökkent a mintákban, jól elkülönülő csoportot alkotnak (negyedik klaszter). Az elnyúló kék sávból látszik, hogy a metabolikus acidózisból az állatok nehezen, csak 48 óra után regenerálódtak, és a késői időpontok piros színei jelzik, hogy némelyik kismolekulánál egy „overshoot” reakció is megfigyelhető. A bélflóra összetételhez és működéshez köthető jelek (ötödik klaszter) az arginin beadását követő első 8 órában még változatlanok, a krezol metabolitok és a fenil-acetil-glicin koncentrációjának növekedése a 24. és a 72. óra közé tehető.

A három dóziscsoport „heat map” ábráját összehasonlítva néhány további következtetés is levonható (23. ábra). A kontroll csoporton belül az állatok között látszanak ugyan különbségek az egyedi metabolikus profilban, de ezek az eltérések kismértékűek, és a kontroll az ábra tanulsága szerint a kísérlet teljes időtartama alatt egységes volt és stabil. Nincsenek deviáns minták, kiugró értékeket tartalmazó spektrumok, sem a teljes csoportra jellemző, tendenciát mutató változások. A kontroll tehát a kísérlet szempontjából megfelelő volt. A kis, szubtoxikus dózissal kezelt állatok ábráján látható az arginin szervezetbe jutására adott közvetlen válasz (pl. ornitin ürítés) és a nagyon enyhe metabolikus acidózis jelei. Az állatok azonban gyakorlatilag 8 óra után teljesen regenerálódtak, és spektrumaik a későbbi időpontokban egységesen a

kontrollnak megfelelő képet mutatják. Az endokrin funkcióval, a bélflóra működéssel és az aminosav anyagcserével kapcsolatba hozható változások ebben a dóziscsoportban elmaradtak.

Az eddigiek alapján tehát a CLASSY ábrák segítségével minden olyan információt ki tudunk nyerni a kísérletben, amelyet korábban az O-PLS-DA és STOCSY elemzések segítségével kaptunk, de lényegesen rövidebb idő alatt. A fenti két módszer (és általában a statisztikai alapon működő modellező eszközök) azonban értelemszerűen az egyes minták egyedi jellemzőinek felderítésében nem adnak segítséget az elemzőnek, így az egyéni röppályák vizsgálata további fáradságos és időigényes feladat. A CLASSY-elemzéssel nyert „heat map” ábráról ugyanakkor közvetlenül leolvasható, ha a vizsgált állatok köre a válaszadás szempontjából alcsoportokra bontható. Az arginin hatásával szemben rezisztenciát mutató állatok metabolikus profilja egységes és a csoport többi tagjától eltérő: a metabolizálatlan arginin ürítése esetükben időben elhúzódik, a glükóz vizeletbeli szintje pedig a csoport többi tagjával szemben nemhogy nem növekszik 8 órával a beadás után, hanem inkább csökken (22. ábra, C). Minden változás a vizeletük kismolekula összetételében hamarabb regenerálódik, mint a többi állatnál, ezért a rezisztens példányok mintái a 8 óra utáni időpontokban csak „zöld csíkként” jelennek meg csoport ábráján (22. ábra, B). (Itt kell megjegyezni, hogy a dolgozatban bemutatott ábrán azért szerepelnek a *gyenge válaszadók* a HD csoport állatai közül az első három helyen a sorrendben, mert a korábbi elemzés alapján már tudtam, hogy tőlük egy egységes, de a többiekétől eltérő profilt kell várnom, így a spektrumok betöltésekor előre raktam a mintáikat. Ha nem lett volna ilyen előzetes ismeret, akkor a hozzájuk tartozó „zöld csíkok” természetesen random pozícióban jelentek volna meg.) A korábbi, O-PLS-DA modelleken alapuló elemzésnél elkerülte a figyelmemet, hogy a rezisztens állatok által ürített ornitin mennyisége lényegesen alacsonyabb, mint a normál válaszadóké (22. ábra, C). A legújabb toxikológiai vizsgálatok alapján az L-ornitin is képes az argininhez hasonlóan dóziszfüggő módon súlyos nekrozissal járó akut hasnyálmirigy-gyulladást előidézni, és modelltoxinnak is alkalmas [150]. Az arginin-modellben az argináz aktivitás gátlása igazoltan csökkenti a hasnyálmirigy károsodását [151], így elképzelhető, hogy az ornitinnak a hatásmechanizmus szempontjából jelentős szerepe van, amit a kísérletünkben a rezisztens állatok mintái alátámasztanak. A CLASSY ábrák

egyértelműen mutatják a nagyságrendi különbséget a metabolit vizeletbeli koncentrációjában, kisebb esélyt adva arra, hogy ez a toxicitás szempontjából jelentőséggel bíró eredmény a jövőben elkerülje az elemző figyelmét. Az ábra tehát azon túl, hogy segítséget ad a válaszadók alcsoportjainak megtalálásához, közvetlenül mutatja a kísérlet szempontjából fontosnak bizonyuló kismolekulák koncentrációváltozásaiban rejlő eltéréseket is, megkönnyítve az eredmény értelmezését.

A 22. ábrán szembetűnő még a krezol és a PAG metabolitok vizeletbeli szintjének nagy egyéni szórása. Ha a krezol-glükuronid jeleire koncentrálna az ábrát kissé átrendezzük, és az egyének közötti hasonlóságot vesszük alapul a klaszterezéshez, akkor *erős* és *gyenge válaszadók* mellett *gyors* és *lassú válaszadókat* is el tudunk különíteni (25. ábra). Mivel ezek a kismolekulák nem kizárólagos és közvetlen anyagcseretermékei a gazdaállatnak, az időben és intenzitásban variábilis válasz itt kevésbé meglepő. Ugyanakkor mindez jó illusztrációja annak, hogy a CLASSY-módszer a korábbiakhoz képest a metabolit fluktuációk időbeli eltéréseit is meg tudja ragadni, nem keverve össze ezt az információt az alapzajjal.

A COMET kísérletsorozat ceruleinnel végzett mérésében a három dóziscsoport vizeletmintái alapján készült „heat map” ábrák (24. ábra) egyértelműen mutatják, hogy nincsenek érdemi eltérések a kontroll és a kezelt állatok vizeletének összetétele között a vizsgálat teljes, egy hetes időtartama alatt. A CLASSY módszer nagy áteresztőképességét mutatja, hogy ehhez az információhoz az elemző több óras fáradságos munka helyett kevesebb mint egy perc alatt hozzájut. A CLASSY segítségével a COMET kísérletsorozat teljes spektrumgyűjteményét pár nap alatt át tudtuk nézni, kiszűrve azokat a kísérleteket, melyek újbóli értékelése érdekes lehet.

A CLASSY fent bemutatott alkalmazásában a kiindulási információ olyan adattábla volt, ahol a sorok egy adott állat egy adott időponthoz tartozó mintájának NMR spektrum jeleit tartalmazták. A táblázatba (pl. a „sorok végére”) azonban megfelelő skálázás után bármilyen egyéb információ is beilleszthető. Az NMR spektrum adatai mellé csatolhatjuk ugyanennek a mintának más analitikai módszerrel, például tömegspektrometriával gyűjtött adatait is, és akkor a Statisztikai Heterospektroszkópiához hasonló alkalmazást nyerünk [27], ahol a metabolom két átfedett, de mégis kissé különböző szegmensének korreláltatásával könnyebbé válik a jelek azonosítása és szélesebb képet tudunk formálni a kismolekulák szintjén zajló

eseményekről. Beilleszthetjük ugyanennek az állatnak az azonos időpontból származó egyéb mintáiról (pl. szérum, szövetek) gyűjtött spektrális adatokat, és vizsgálhatjuk a különböző kompartmentek metabolit-fluktuációjának korrelációs mintázatát („integrated metabonomics”). A kiegészítő információ származhat más omikákból is, például lehet microarray adat, és akkor a genom és a metabolom szintjén zajló események kapcsolatáról kaphatunk képet („Top-down systems biology”). A fentiek egyelőre csak elméleti lehetőségek, és csak kiragadott példák a számtalan felhasználási mód közül. A gyakorlati megvalósítás során nem kevés adatelőkészítési problémával kell megküzdenünk, de reményeink szerint hamarosan a CLASSY módszer kiterjesztett változataival is bővíteni tudjuk a rendszerbiológusok adatelemző fegyvertárát.

7. Következtetések

7.1. Exokrin hasnyálmirigy-gyulladást előidéző modelltoxinok

7.1.1. L-argininnel előidézett exokrin hasnyálmirigy-gyulladás

Egy ideális állatkísérletes modell könnyen kivitelezhető, megismételhető és jól reprodukálja a humán betegség kialakulását, valamint klinikai, laboratóriumi és szövettani tüneteit. Az akut hasnyálmirigy-gyulladásnak ilyen, minden igényt kielégítő modellje egyelőre nem létezik. Mindenképpen előnyt jelent ugyanakkor, ha a kutatók részletesen ismerik a rendelkezésre álló modellek jellemzőit, előnyeit/hátrányait és extrapolálhatóságuk korlátait, hisz így könnyebben tudják kiválasztani a vizsgálatuk céljainak leginkább megfelelő eljárást. Az arginin-alapú hasnyálmirigy-gyulladás modell metabonomikai vizsgálata rávilágított a módszer néhány nem, vagy kevésbé ismert előnyére és hiányosságára.

A COMET kísérlet alapján az alkalmazott dózisban az arginin-toxicitás valóban nem érint a pankréáson kívül egyéb szervet. Ugyanakkor, mivel a modellanyag központi szerepet játszik számos biokémiai folyamatban, korai hatásként számolni kell azzal, hogy nagy dózisban történő adminisztrációja kiterjedt zavart okoz alapvető anyagcsere-útvonalakon is.

A hisztopatológiai vizsgálatok sem ebben a kísérletben, sem az irodalomban fellelhető korábbi kísérletekben nem találtak súlyosabb morfológiai elváltozást a beadást követően rövid időn belül elpusztult, *erős válaszadó* példányok szöveteiben. Feltételezésünk szerint a kialakuló metabolikus acidózis az oka a kísérleti állatok relatíve magas halálozási arányának ebben a modellben. Az egyszeri nagy dózis helyett a gyakorlatban szokás két 2000-2500 mg/kg dózisú arginin-injekció egy óra eltéréssel történő beadása is [148,152]. Elképzelhető, hogy ez szerencsésebb kezelési mód, erről azonban nem találtam statisztikát az irodalomban.

A felsorolt hátrányok mellett potenciális előnye lehet az arginin-modell alkalmazásának, hogy a hatás kiterjed a bélflóra működésére is, így annak

megváltozása, majd regenerálódása az állatkísérletben jól vizsgálható, és esetleg következtetéseket enged levonni humán esetekre is.

7.1.2. 1-ciano-2-hidroxi-3-buténnel előidézett exokrin hasnyálmirigy-gyulladás

Az 1-ciano-2-hidroxi-3-butén részben az állati takarmányban és az emberi táplálékban való előfordulása miatt, részben a patkányokon végzett állatkísérletekben tapasztalt akut hasnyálmirigy-gyulladás szokatlan mechanizmusa miatt kapott figyelmet a kutatók részéről. Az utóbbinak köszönhetően választották a COMET kísérletek egyik modelltoxinjának. A kísérletben a szövettani és a klinikai kémiai eredmények összhangban álltak a szakirodalomban leírt megfigyelésekkel. Az állatkísérletes modellel kapcsolatos eddigi eredményeket a kismolekulák szintjén tapasztalható változások meghatározásával egészítettem ki.

Az anyavegyület fő metabolitjaként egy *N*-acetyl-ciszteinnel konjugált telített származékot tudtam azonosítani. Ez a szerkezet meglepetést okozott, mert elsődleges lebontási terméként epoxid képzés és detoxifikálás útvonalon keletkező hidroxil vagy diol származékot tartottam volna valószínűbbnek. Az 1D NMR spektrumok STOCSY analízise és a 2D NMR mérések azonban egyértelműen kizárták a várt szerkezetek lehetőségét.

A kísérlet korai időpontjaiban az egységes válasznak köszönhetően xenobiotikum-endogén kismolekula korrelációt is lehetett vizsgálni STOCSY elemzés segítségével, annak ellenére, hogy a mintaszám relatíve alacsony volt ($n=10$). A késői időpontokban a kezelt állatok válaszána diverzitása viszont lehetetlenné tette a statisztikai alapon történő értékelést. Ez általánosan jelentkező probléma kis mintaszámokkal dolgozó toxicitásvizsgálatoknál.

A kísérletben az endogén kismolekulák szintjén megfigyelt változások egy része az állatok csökkent étvágyával és elégtelen emésztésével is összefüggésbe hozható, így a modelltoxinnak ezekre a metabolitokra gyakorolt közvetlen hatását nem tudtam vizsgálni. Egyértelműen megállapítható ugyanakkor, hogy az állatok hasnyálmirigyének súlyos károsodása ellenére ebben a kísérletben nem utalnak jelek a bélflóra összetételének és működésének megváltozására. Végül, a 2'-deoxicitidin vizeletbeli

koncentrációjának konzisztens emelkedése olyan egyedi jellemzője a CHB-toxicitásnak, mely esetleg összefüggésbe hozható a hatásmechanizmusával.

7.1.3. Ceruleinrel előidézett exokrin hasnyálmirigy-gyulladás

A kísérletben a szövettani, klinikai kémiai és metabonomikai vizsgálat is arra utalt, hogy a kívánt toxikus hatást nem sikerült elérni. Ennek legvalószínűbb oka az alacsony dózis választása volt. Az adatkészletet ugyanakkor fel tudtuk használni a CLASSY módszer validálásához fals pozitív eredmény tesztelésénél.

7.2. Klaszteranalízisen alapuló adatelemző módszer (CLASSY)

A CLASSY-módszer fejlesztésével arra tettünk kísérletet, hogy az eredmények megbízhatóságának megtartása mellett csökkentsük a spektrális adatok elemzésére és interpretálására fordítandó időt és energiát. A tesztelés során megbizonyosodhattunk arról, hogy a CLASSY más módszereknél gyorsabban teszi lehetővé, hogy szűrjük a kísérlet szempontjából fontos, változásokat mutató kismolekulák körét, és hatékony segítséget nyújt ahhoz is, hogy ezek kémiai szerkezetét megállapítsuk. A különböző szinteken korrelált spektrális jelek csoportosítása útján könnyebbé válik a kismolekulák bonyolult biokémiai, élettani kapcsolatainak felderítése. A kvantitatív spektrális információ megjelenítésével gyorsan, átfogó képet formálhatunk a kísérletről: ellenőrizni tudjuk a kontroll csoport megbízhatóságát, a folyamatok dózisfüggését és a kismolekulák vizeletbeli szintjének időbeli fluktuációját. Azonosítani tudjuk az egyedi válaszadókat, az eltérő mértékben reagáló válaszadókat, és azokat a folyamatokat ahol időbeli eltérés van a válaszadásban.

A metabonomika megszületését az tette lehetővé, hogy rendelkezésre álltak olyan nagy áteresztőképességű és nagy hatékonyságú analitikai módszerek, mint az NMR vagy az MS. Virágzásnak akkor indult, amikor az adatfeldolgozás már nem vett hónapokat igénybe, tehát az analitikai módszer tulajdonságaihoz igazított kemometriai eszköztár a feldolgozás folyamatát is nagy áteresztőképességűvé tudta tenni. Ezen a ponton azonban, amikor arra lenne szükség, hogy a szépen szűrt és rendszerezett eredményeket biológiai szempontból értelmezzük, megint csak elakadni, lassulni látszik a folyamat. Egyre gyakrabban tapasztaljuk, hogy speciális területek nagy tudású

szakértőit kellene bevonni a munkába, legalább egy-egy kérdés, vagy rövid konzultáció erejéig. Ilyen jellegű segítségre azonban egy bonyolult adatgyűjtő technikán alapuló módszer csak akkor számíthat, ha szemléletes, könnyen áttekinthető formában tudja az eredmények teljes és torzításmentes palettáját prezentálni. A jelek azonosítása után a CLASSY ábrák értelmezése nem igényel jártasságot sem az NMR spektroszkópia, sem az MVDA területén. Úgy gondoljuk ezért, hogy alkalmas arra, hogy segítségével a kutatók mind szélesebb körét vonjuk be a metabonomikai vizsgálatokba, és azt is lehetővé teszi, hogy a különböző területek szakértői minden előzetes képzés nélkül közvetlenül, rutinszerűen használjanak fel metabonomikai mérésekből származó információt a mindennapi munkájukban.

8. Összefoglalás

Exokrin hasnyálmirigy-gyulladást előidéző modelltoxinok hatásának metabonomikai vizsgálatát végeztem kétféle dózissal kezelt Sprague-Dawley patkányok esetében, az állatok mintáinak kismolekula-összetétel változását 7 napon keresztül követve. A kísérlet időtartama alatt folyamatosan gyűjtött vizeletminták és szérumminták ^1H NMR spektrumainak elemzését klinikai kémiai és hisztológiai vizsgálatokból származó adatok elemzésével egészítettem ki. Projekción és korreláció-analízisen alapuló kemometriai módszereket alkalmaztam az adatok feldolgozásához.

Az L-arginin intraperitoneális injekciójával előidézett hasnyálmirigy-gyulladás modell esetében a minták kismolekula-összetételében megfigyelhető időbeli és korrelációs mintázat alapján a patológiás folyamatot öt fő eseményre tudtam bontani. a) A keringésbe jutó nagy mennyiségű argininre adott közvetlen válasz, melyet az urea-ciklus és a transzaminálási folyamatok gyorsulása jellemezett. b) Az aminosav-lebontás zavara, mely egyes aminosavak vizeletbe történő közvetlen ürítését eredményezte. c) Enyhe átmeneti endokrin toxicitás. d) Metabolikus acidózis kialakulása. e) A bélflóra összetételének és működésének átmeneti változása.

Az 1-ciano-2-hidroxi-3-butén modellvegyülettel végzett kísérletben a spektrális információ korreláció-analízisével sikerült azonosítani az anyavegyület fő metabolitjának szerkezetét, valamint vizsgálni tudtam a xenobiotikum-metabolit és az endogén kismolekulák koncentrációja közötti kapcsolatot. Toxicitáshoz köthető specifikus markerknek a vizelet 2'-dezoxicitidin tartalma bizonyult.

Dolgozatom utolsó fejezetében egy új fejlesztésű, biológiai minták ^1H NMR spektrumainak elemzését szolgáló kemometriai eljárást mutatok be. A Klaszteranalízisen alapuló Statisztikai Spektroszkópia (CLASSY) kétféle csoportelemzési módszer kombinálásával azonosítja a szerkezeti okokból korrelált spektrális csúcsok csoportjait, és felfedi a kismolekula koncentrációk időbeli változásának mintázatában rejlő hasonlóságokat. A módszer nagy áteresztőképességű adatelemző eszköznek bizonyult, mert alkalmas a kismolekulák gyors azonosítására, a biokémiai és élettani kapcsolataik felderítésére, a válaszadók alcsoportjainak illetve deviáns, kívülálló mintáknak az elkülönítésére. Az eredmények könnyen értelmezhető megjelenítésével nagyban segíti az elemző munkáját, és lehetővé teszi szélesebb szakmai kör számára is metabonomikai adatok közvetlen feldolgozását.

9. Summary

The time-related metabolic responses to model exocrine pancreatic toxins were investigated over a 7 day experimental period in male Sprague-Dawley rats exposed to a single low or high dose. Sequential timed urine and plasma samples were analysed using high resolution ^1H NMR spectroscopy together with complementary clinical chemistry assays and terminal histopathology. Projection and correlation based chemometric methods were utilized to extract and identify metabolites relevant to toxicity and to construct metabolic trajectories post administration.

The time course and correlation pattern of changes in metabolic profiles in L-arginine-induced exocrine pancreatitis indicated that the pathological process involved five major events: direct response to high quantity of L-arginine entering circulation with increased urea-cycle and transamination activity, perturbed amino acid catabolism with many of the amino acids excreted directly to urine, mild and temporal endocrine toxicity, metabolic acidosis, and perturbed gut microbial function with elevated phenylacetyl-glycine and cresol-metabolites in urine.

The application of a spectral correlation technique Statistical Total Correlation Spectroscopy to detect both structural and toxicological connectivities between xenobiotic and endogenous metabolite signals in ^1H NMR spectra of biofluids is illustrated in the study involving 1-cyano-2-hydroxy-3-butene with the major detoxification product of the model toxin identified.

A new approach for data analysis, information recovery and display of biological ^1H NMR spectra is also presented. The method termed Cluster Analysis Statistical Spectroscopy (CLASSY) identifies structurally related spectral peaks and arranges metabolites by similarity of temporal dynamic variation in a high-throughput manner utilizing a novel correlation clustering scheme. The advantages of the approach in rapid identification of structurally related peaks and in deconvolution of biochemical and physiological relationships between metabolites in complex disease processes are demonstrated, and usefulness in identification of subgroups of responders and outliers is illustrated. The novel graphical format aids visualization of data and increases interpretability and expected to make metabonomic studies more accessible to a wider research audience.

10. Hivatkozott irodalmak jegyzéke

- [1] Nicholson JK, Buckingham MJ, Sadler PJ. High resolution ^1H n.m.r. studies of vertebrate blood and plasma. *Biochem. J* 1983 Jun 1;211(3): pp. 605-615.
- [2] Nicholson JK, Wilson ID. High resolution proton magnetic resonance spectroscopy of biological fluids. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* 1989;21(4-5): pp. 449-501.
- [3] Nicholson JK, Timbrell JA, Sadler PJ. Proton NMR spectra of urine as indicators of renal damage. Mercury-induced nephrotoxicity in rats. *Mol. Pharmacol.* 1985 Jun;27(6): pp. 644-651.
- [4] Gartland KP, Sanins SM, Nicholson JK, Sweatman BC, Beddell CR, Lindon JC. Pattern recognition analysis of high resolution ^1H NMR spectra of urine. A nonlinear mapping approach to the classification of toxicological data. *NMR Biomed.* 1990 Aug;3(4): pp. 166-172.
- [5] Gartland KP, Beddell CR, Lindon JC, Nicholson JK. Application of pattern recognition methods to the analysis and classification of toxicological data derived from proton nuclear magnetic resonance spectroscopy of urine. *Mol. Pharmacol.* 1991 May;39(5): pp. 629-642.
- [6] Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E. 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica* 1999 Nov;29(11): pp. 1181-1189.
- [7] Fiehn O. Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks. *Comp. Funct. Genomics* 2001;2(3): pp. 155-168.
- [8] Lenz EM, Wilson ID. Analytical strategies in metabonomics. *J. Proteome Res.* 2007 Feb;6(2): pp. 443-458.

- [9] Lindon JC, Nicholson JK. Analytical technologies for metabonomics and metabolomics, and multi-omic information recovery. *TrAC Trend. Anal. Chem.* 2008 3;27(3): pp. 194-204.
- [10] Dettmer K. Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrom. Rev.* 2007;26(1): pp. 51.
- [11] Wu Z. The Application of Chromatography-Mass Spectrometry: Methods to Metabonomics. *Chromatographia* 2009;69: pp. 23-32.
- [12] Keun HC, Ebbels TM, Antti H, Bollard ME, Beckonert O, Schlotterbeck G, Senn H, Niederhauser U, Holmes E, Lindon JC, Nicholson JK. Analytical reproducibility in (1)H NMR-based metabonomic urinalysis. *Chem. Res. Toxicol.* 2002 Nov;15(11): pp. 1380-1386.
- [13] Fonville JM, Maher AD, Coen M, Holmes E, Lindon JC, Nicholson JK. Evaluation of full-resolution J-resolved 1H NMR projections of biofluids for metabonomics information retrieval and biomarker identification. *Anal. Chem.* 2010 Mar 1;82(5): pp. 1811-1821.
- [14] Keun HC, Beckonert O, Griffin JL, Richter C, Moskau D, Lindon JC, Nicholson JK. Cryogenic probe 13C NMR spectroscopy of urine for metabonomic studies. *Anal. Chem.* 2002 Sep 1;74(17): pp. 4588-4593.
- [15] Keun HC, Athersuch TJ, Beckonert O, Wang Y, Saric J, Shockcor JP, Lindon JC, Wilson ID, Holmes E, Nicholson JK. Heteronuclear 19F-1H statistical total correlation spectroscopy as a tool in drug metabolism: study of flucloxacillin biotransformation. *Anal. Chem.* 2008 Feb 15;80(4): pp. 1073-1079.
- [16] Wang Y, Cloarec O, Tang H, Lindon JC, Holmes E, Kochhar S, Nicholson JK. Magic angle spinning NMR and 1H-31P heteronuclear statistical total correlation spectroscopy of intact human gut biopsies. *Anal. Chem.* 2008 Feb 15;80(4): pp. 1058-1066.

- [17] Lindon JC, Nicholson JK, Wilson ID. Directly coupled HPLC-NMR and HPLC-NMR-MS in pharmaceutical research and development. *J. Chromatogr. B* 2000 Oct 1;748(1): pp. 233-258.
- [18] Schewitz J, Gfrorer P, Pusecker K, Tseng LH, Albert K, Bayer E, Lindon JC, Nicholson JK, Wilson ID. Directly coupled CZE-NMR and CEC-NMR spectroscopy for metabolite analysis: paracetamol metabolites in human urine. *Analyst* 1998 Dec;123(12): pp. 2835-2837.
- [19] Shockcor JP, Unger SE, Wilson ID, Foxall PJ, Nicholson JK, Lindon JC. Combined HPLC, NMR spectroscopy, and ion-trap mass spectrometry with application to the detection and characterization of xenobiotic and endogenous metabolites in human urine. *Anal. Chem.* 1996 Dec 15;68(24): pp. 4431-4435.
- [20] Pearson K. On lines and planes of closest fit to systems of points in space. *Philos. Mag.* 1901;2: pp. 559-572.
- [21] Lindon JC, Holmes E, Nicholson JK. Pattern recognition methods and applications in biomedical magnetic resonance. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* 2001 7/2;39(1): pp. 1-40.
- [22] Pearce JT, Athersuch TJ, Ebbels TM, Lindon JC, Nicholson JK, Keun HC. Robust algorithms for automated chemical shift calibration of 1D ¹H NMR spectra of blood serum. *Anal. Chem.* 2008 Sep 15;80(18): pp. 7158-7162.
- [23] Crockford DJ, Keun HC, Smith LM, Holmes E, Nicholson JK. Curve-fitting method for direct quantitation of compounds in complex biological mixtures using ¹H NMR: application in metabonomic toxicology studies. *Anal. Chem.* 2005 Jul 15;77(14): pp. 4556-4562.
- [24] Trygg J, Wold S. Orthogonal projections to latent structures (O-PLS). *J. Chemometr.* 2002;16(3): pp. 119-128.

- [25] Bylesjö M, Rantalainen M, Cloarec O, Nicholson JK, Holmes E, Trygg J. OPLS discriminant analysis: combining the strengths of PLS-DA and SIMCA classification. *J. Chemometr.* 2007 Aug 20: pp. 341-351.
- [26] Cloarec O, Dumas ME, Craig A, Barton RH, Trygg J, Hudson J, Blancher C, Gaugier D, Lindon JC, Holmes E, Nicholson JK. Statistical total correlation spectroscopy: an exploratory approach for latent biomarker identification from metabolic ¹H NMR data sets. *Anal. Chem.* 2005 Mar 1;77(5): pp. 1282-1289.
- [27] Crockford DJ, Holmes E, Lindon JC, Plumb RS, Zirah S, Bruce SJ, Rainville P, Stumpf CL, Nicholson JK. Statistical heterospectroscopy, an approach to the integrated analysis of NMR and UPLC-MS data sets: application in metabonomic toxicology studies. *Anal. Chem.* 2006 Jan 15;78(2): pp. 363-371.
- [28] Bylesjö M, Rantalainen M, Nicholson J, Holmes E, Trygg J. K-OPLS package: kernel-based orthogonal projections to latent structures for prediction and interpretation in feature space. *BMC bioinformatics* 2008;9: pp. 106.
- [29] Sands CJ, Coen M, Ebbels TM, Holmes E, Lindon JC, Nicholson JK. Data-driven approach for metabolite relationship recovery in biological ¹H NMR data sets using iterative statistical total correlation spectroscopy. *Anal. Chem.* 2011 Mar 15;83(6): pp. 2075-2082.
- [30] Weljie AM, Newton J, Mercier P, Carlson E, Slupsky CM. Targeted profiling: quantitative analysis of ¹H NMR metabolomics data. *Anal. Chem.* 2006 Jul 1;78(13): pp. 4430-4442.
- [31] Guy C, Kopka J, Moritz T. Plant metabolomics coming of age. *Physiol. Plantarum* 2008;132(2): pp. 113-116.
- [32] Wishart DS. Metabolomics: applications to food science and nutrition research. *Trends Food Sci. Tech.* 2008 9;19(9): pp. 482-493.

- [33] Bundy JG, Spurgeon DJ, Svendsen C, Hankard PK, Weeks JM, Osborn D. Environmental metabonomics: applying combination biomarker analysis in earthworms at a metal contaminated site. *Ecotoxicology* 2004 Nov;13(8): pp. 797-806.
- [34] Duarte IF, Legido-Quigley C, Parker DA, Swann JR, Spraul M, Braumann U, Gil AM, Holmes E, Nicholson JK, Murphy GM, Vilca-Melendez H, Heaton N, Lindon JC. Identification of metabolites in human hepatic bile using 800 MHz ¹H NMR spectroscopy, HPLC-NMR/MS and UPLC-MS. *Mol. Biosys.* 2009 Feb;5(2): pp. 180-190.
- [35] Huang JT, Leweke FM, Tsang TM, Koethe D, Kranaster L, Gerth CW. CSF metabolic and proteomic profiles in patients prodromal for psychosis. *PloS one* 2007 Aug 22;2(1): pp. e756.
- [36] Maher AD, Cloarec O, Patki P, Craggs M, Holmes E, Lindon JC, Nicholson JK. Dynamic biochemical information recovery in spontaneous human seminal fluid reactions via ¹H NMR kinetic statistical total correlation spectroscopy. *Anal. Chem.* 2009 Jan 1;81(1): pp. 288-295.
- [37] Takeda I, Stretch C, Barnaby P, Bhatnager K, Rankin K, Fu H, Weljie A, Naresh J, Slupsky C. Understanding the human salivary metabolome. *NMR Biomed.* 2009;22(6): pp. 577-584.
- [38] Young SP, Wallace GR. Metabolomic analysis of human disease and its application to the eye. *J. Ocul Biol. Dis. Infor.* 2009 Nov 13;2(4): pp. 235-242.
- [39] Graca G, Duarte IF, Barros AS, Goodfellow BJ, Diaz S, Carreira IM. (¹H)NMR based metabonomics of human amniotic fluid for the metabolic characterization of fetus malformations. *J. Proteome Res.* 2009 Aug;8(8): pp. 4144-4150.
- [40] Beckonert O, Coen M, Keun HC, Wang Y, Ebbels TM, Holmes E, Lindon JC, Nicholson JK. High-resolution magic-angle-spinning NMR spectroscopy for metabolic profiling of intact tissues. *Nat. Protoc.* 2010;5(6): pp. 1019-1032.

- [41] Waters NJ, Holmes E, Williams A, Waterfield CJ, Farrant RD, Nicholson JK. NMR and pattern recognition studies on the time-related metabolic effects of alpha-naphthylisothiocyanate on liver, urine, and plasma in the rat: an integrative metabonomic approach. *Chem. Res. Toxicol.* 2001 Oct;14(10): pp. 1401-1412.
- [42] Coen M, Lenz EM, Nicholson JK, Wilson ID, Pognan F, Lindon JC. An integrated metabonomic investigation of acetaminophen toxicity in the mouse using NMR spectroscopy. *Chem. Res. Toxicol.* 2003 Mar;16(3): pp. 295-303.
- [43] Engelke U. *Handbook of 1H-NMR spectroscopy in inborn errors of metabolism.* ; 2007.
- [44] Maher AD, Lindon JC, Nicholson JK. (1)H NMR-based metabonomics for investigating diabetes. *Future Med. Chem.* 2009 Jul;1(4): pp. 737-747.
- [45] Chen P, Liu J. Metabonomics and diabetes mellitus. *Adv. Ther.* 2007 Sep-Oct;24(5): pp. 1036-1045.
- [46] Chen J, Zhao X, Fritsche J, Yin P, Schmitt-Kopplin P, Wang W, Lu X, Häring HU, Schleicher ED, Lehmann R, Xu G. Practical approach for the identification and isomer elucidation of biomarkers detected in a metabonomic study for the discovery of individuals at risk for diabetes by integrating the chromatographic and mass spectrometric information. *Anal. Chem.* 2008 Feb 15;80(4): pp. 1280-1289.
- [47] Bao Y, Zhao T, Wang X, Qiu Y, Su M, Jia W, Jia W. Metabonomic variations in the drug-treated type 2 diabetes mellitus patients and healthy volunteers. *J. Proteome Res.* 2009 Apr;8(4): pp. 1623-1630.
- [48] Vilasi A, Cutillas PR, Maher AD, Zirah SF, Capasso G, Norden AW, Holmes E., Nicholson JK, Unwin RJ. Combined proteomic and metabonomic studies in three genetic forms of the renal Fanconi syndrome. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2007 Aug;293(2): pp. F456-67.

[49] Beger RD, Holland RD, Sun J, Schnackenberg LK, Moore PC, Dent CL, Devarajan P, Portilla D. Metabonomics of acute kidney injury in children after cardiac surgery. *Pediatr. Nephrol.* 2008 Jun;23(6): pp. 977-984.

[50] Portilla D. Metabolomics as an extension of proteomic analysis: study of acute kidney injury. *Semin. Nephrol.* 2007;27(6): pp. 609.

[51] Wishart DS. Metabolomics: the principles and potential applications to transplantation. *Am. J. Transplant.* 2005 Dec;5(12): pp. 2814-2820.

[52] Wishart DS. Metabolomics in monitoring kidney transplants. *Curr. Opin. Nephrol. Hy.* 2006;15(6): pp. 637.

[53] Duarte IF. Metabolic assessment of human liver transplants from biopsy samples at the donor and recipient stages using high-resolution magic angle spinning ¹H NMR spectroscopy. *Anal. Chem.* 2005;77(17): pp. 5570.

[54] Cheng LL, Chang IW, Louis DN, Gonzalez RG. Correlation of high-resolution magic angle spinning proton magnetic resonance spectroscopy with histopathology of intact human brain tumor specimens. *Cancer Res.* 1998 May 1;58(9): pp. 1825-1832.

[55] Sitter B, Sonnewald U, Spraul M, Fjosne HE, Gribbestad IS. High-resolution magic angle spinning MRS of breast cancer tissue. *NMR Biomed.* 2002 Aug;15(5): pp. 327-337.

[56] Chan EC, Koh PK, Mal M, Cheah PY, Eu KW, Backshall A, Cavill R, Nicholson JK, Keun HC. Metabolic profiling of human colorectal cancer using high-resolution magic angle spinning nuclear magnetic resonance (HR-MAS NMR) spectroscopy and gas chromatography mass spectrometry (GC/MS). *J. Proteome Res.* 2009 Jan;8(1): pp. 352-361.

[57] Balog J, Szaniszló T, Schaefer KC, Denes J, Lopata A, Godorhazy L, Szalay D, Balogh L, Sasi-Szabo L, Toth M, Takats Z. Identification of biological tissues by rapid evaporative ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.* 2010 Sep 1;82(17): pp. 7343-7350.

- [58] Schafer KC, Denes J, Albrecht K, Szaniszlo T, Balog J, Skoumal R, Katona M, Tóth M, Balogh L, Takáts Z. In vivo, in situ tissue analysis using rapid evaporative ionization mass spectrometry. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2009;48(44): pp. 8240-8242.
- [59] Stamler J, Elliott P, Dennis B, Dyer AR, Kesteloot H, Liu K, Ueshima H, Zhou BF. INTERMAP: background, aims, design, methods, and descriptive statistics (nondietary). *J. Hum. Hypertens.* 2003 Sep;17(9): pp. 591-608.
- [60] Holmes E, Wilson ID, Nicholson JK. Metabolic phenotyping in health and disease. *Cell* 2008 Sep 5;134(5): pp. 714-717.
- [61] Holmes E, Loo RL, Stamler J, Bictash M, Yap IK, Chan Q, Ebbels T, De Iorio M, Brown IJ, Veselkov KA, Daviglus ML, Kesteloot H, Ueshima H, Zhao L, Nicholson JK, Elliott P. Human metabolic phenotype diversity and its association with diet and blood pressure. *Nature* 2008 May 15;453(7193): pp. 396-400.
- [62] Bictash M, Ebbels TM, Chan Q, Loo RL, Yap IK, Brown IJ, De Iorio M, Daviglus ML, Holmes E, Stamler J, Nicholson JK, Elliott P. Opening up the "Black Box": metabolic phenotyping and metabolome-wide association studies in epidemiology. *J. Clin. Epidemiol.* 2010 Sep;63(9): pp. 970-979.
- [63] Clayton TA, Lindon JC, Cloarec O, Antti H, Charuel C, Hanton G, Provost JP, Le Net JL, Baker D, Walley RJ, Everett JR, Nicholson JK. Pharmaco-metabonomic phenotyping and personalized drug treatment. *Nature* 2006 Apr 20;440(7087): pp. 1073-1077.
- [64] Li H, Ni Y, Su M, Qiu Y, Zhou M, Qiu M, Zhao A, Zhao L, Jia W. Pharmacometabonomic phenotyping reveals different responses to xenobiotic intervention in rats. *J. Proteome Res.* 2007 Apr;6(4): pp. 1364-1370.
- [65] Nicholson JK, Holmes E, Wilson ID. Gut microorganisms, mammalian metabolism and personalized health care. *Nat. Rev. Microbiol.* 2005 May;3(5): pp. 431-438.

- [66] Clayton TA, Baker D, Lindon JC, Everett JR, Nicholson JK. Pharmacometabonomic identification of a significant host-microbiome metabolic interaction affecting human drug metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A.* 2009 Aug 25;106(34): pp. 14728-14733.
- [67] Martin FP, Dumas ME, Wang Y, Legido-Quigley C, Yap IK, Tang H, Zirah S, Murphy GM, Cloarec O, Lindon JK, Sprenger N, Fay LB, Kochhar S, van Bladeren P, Holmes E, Nicholson JK. A top-down systems biology view of microbiome-mammalian metabolic interactions in a mouse model. *Mol. Syst. Biol.* 2007;3: pp. 112.
- [68] Li M, Wang B, Zhang M, Rantalainen M, Wang S, Zhou H, Su M, Qiu Y, Jia W, Xiao C, Smith LM, Yang S, Holmes E, Tang H, Zhao G, Nicholson JK, Li L, Zhao L. Symbiotic gut microbes modulate human metabolic phenotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A.* 2008 Feb 12;105(6): pp. 2117-2122.
- [69] Raamsdonk LM, Teusink B, Broadhurst D, Zhang N, Hayes A, Walsh MC, Berden JA, Brindle KM, Kell DB, Rowland JJ, Westerhoff HV, van Dam K, Oliver SD. A functional genomics strategy that uses metabolome data to reveal the phenotype of silent mutations. *Nat. Biotechnol.* 2001 Jan;19(1): pp. 45-50.
- [70] Lehtimäki KK, Valonen PK, Griffin JL, Vaisanen TH, Grohn OH, Kettunen MI, Vepsäläinen J, Ylä-Herttuala S, Nicholson JK, Kauppinen RA. Metabolite changes in BT4C rat gliomas undergoing ganciclovir-thymidine kinase gene therapy-induced programmed cell death as studied by ¹H NMR spectroscopy in vivo, ex vivo, and in vitro. *J. Biol. Chem.* 2003 Nov 14;278(46): pp. 45915-45923.
- [71] Gavaghan McKee CL, Wilson ID, Nicholson JK. Metabolic Phenotyping of Nude and Normal (Alpk:ApfCD, C57BL10J) Mice. *J. Proteome Res.* 2006 Feb 3;5(2): pp. 378-384.
- [72] Craig A, Sidaway J, Holmes E, Orton T, Jackson D, Rowlinson R, Nickson J, Tonge R, Wilson I, Nicholson JK. Systems toxicology: integrated genomic, proteomic and metabonomic analysis of methapyrilene induced hepatotoxicity in the rat. *J. Proteome Res.* 2006 Jul;5(7): pp. 1586-1601.

[73] Dumas ME, Wilder SP, Bihoreau MT, Barton RH, Fearnside JF, Argoud K, D'Amato L, Wallis RH, Blancher C, Keun HC, Baunsgaard D, Scott J, Grove Sidelmann U, Nicholson JK, Gauguier D. Direct quantitative trait locus mapping of mammalian metabolic phenotypes in diabetic and normoglycemic rat models. *Nat. Genet.* 2007 May;39(5): pp. 666-672.

[74] Richards SE, Dumas M, Fonville JM, Ebbels TMD, Holmes E, Nicholson JK. Intra- and inter-omic fusion of metabolic profiling data in a systems biology framework. *Chemometr. Intell. Lab.* 2010 11/15;104(1): pp. 121-131.

[75] Lindon JC, Nicholson JK, Holmes E, Antti H, Bollard ME, Keun H, Beckonert O, Ebbels TM, Reily MD, Robertson D, Stevens GJ, Luke P, Breau AP, Cantor GC, Bible RH, Niederhauser U, Senn H, Schlotterbeck G, Sidelmann UG, Laursen SM, Tymiak A, Car BD, Lehman-McKeeman L, Colet JM, Loukaci A, Thomas C. Contemporary issues in toxicology the role of metabonomics in toxicology and its evaluation by the COMET project. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2003 Mar 15;187(3): pp. 137-146.

[76] Lindon JC, Keun HC, Ebbels TM, Pearce JM, Holmes E, Nicholson JK. The Consortium for Metabonomic Toxicology (COMET): aims, activities and achievements. *Pharmacogenomics* 2005 Oct;6(7): pp. 691-699.

[77] Ebbels T, Keun H, Beckonert O, Antti H, Bollard M, Holmes E, Lindon JC, Nicholson JK. Toxicity classification from metabonomic data using a density superposition approach: 'CLOUDS'. *Anal. Chim. Acta* 2003/8/25;490(1-2): pp. 109-122.

[78] Ebbels TMD, Keun HC, Beckonert OP, Bollard ME, Lindon JC, Holmes E, Nicholson JK. Prediction and Classification of Drug Toxicity Using Probabilistic Modeling of Temporal Metabolic Data: The Consortium on Metabonomic Toxicology Screening Approach. *J. Proteome Res.* 2007;6(11): pp. 4407-4422.

[79] Bollard ME, Stanley EG, Lindon JC, Nicholson JK, Holmes E. NMR-based metabonomic approaches for evaluating physiological influences on biofluid composition. *NMR Biomed.* 2005 May;18(3): pp. 143-162.

- [80] Gavaghan CL, Nicholson JK, Connor SC, Wilson ID, Wright B, Holmes E. Directly coupled high-performance liquid chromatography and nuclear magnetic resonance spectroscopic with chemometric studies on metabolic variation in Sprague-Dawley rats. *Anal. Biochem.* 2001 Apr 15;291(2): pp. 245-252.
- [81] Robosky LC, Wells DF, Egnash LA, Manning ML, Reily MD, Robertson DG. Metabonomic Identification of Two Distinct Phenotypes in Sprague-Dawley (CrI:CD(SD)) Rats. *Toxicol. Sci.* September 2005 September 2005;87(1): pp. 277-284.
- [82] Azmi J, Griffin JL, Shore RF, Holmes E, Nicholson JK. Chemometric analysis of biofluids following toxicant induced hepatotoxicity: a metabonomic approach to distinguish the effects of 1-naphthylisothiocyanate from its products. *Xenobiotica* 2005 Aug;35(8): pp. 839-852.
- [83] Bollard ME, Keun HC, Beckonert O, Ebbels TM, Antti H, Nicholls AW, Lindon JC, Nicholson JK. Comparative metabonomics of differential hydrazine toxicity in the rat and mouse. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2005 Apr 15;204(2): pp. 135-151.
- [84] Waters NJ, Waterfield CJ, Farrant RD, Holmes E, Nicholson JK. Metabonomic deconvolution of embedded toxicity: application to thioacetamide hepato- and nephrotoxicity. *Chem. Res. Toxicol.* 2005 Apr;18(4): pp. 639-654.
- [85] Skordi E, Yap IK, Claus SP, Martin FP, Cloarec O, Lindberg J, Schuppe-Koistinen I, Holmes E, Nicholson JK. Analysis of time-related metabolic fluctuations induced by ethionine in the rat. *J. Proteome Res.* 2007 Dec;6(12): pp. 4572-4581.
- [86] Coen M, Hong YS, Clayton TA, Rohde CM, Pearce JT, Reily MD, Lindon JC, Nicholson JK. The mechanism of galactosamine toxicity revisited; a metabonomic study. *J. Proteome Res.* 2007 Jul;6(7): pp. 2711-2719.
- [87] Lindon JC, Nicholson JK, Holmes E, Keun HC, Craig A, Pearce JT, Bruce SJ, Hardy N, Sansone SA, Antti H, Jonsson P, Daykin C, Navarange M, Beger RD, Verheij ER, Amberg A, Baunsgaard D, Cantor GH, Lehman-McKeeman L, Earll M, Wold S, Johansson E, Haselden JN, Kramer K, Thomas C, Lindberg J, Schuppe-Koistinen I, Wilson ID, Reily MD, Robertson DG, Senn H, Krotzky A, Kochhar S, Powell J, van der

Ouderaa F, Plumb R, Schaefer H, Spraul M. Summary recommendations for standardization and reporting of metabolic analyses. *Nat. Biotechnol.* 2005 Jul;23(7): pp. 833-838.

[88] Castle AL, Fiehn O, Kaddurah-Daouk R, Lindon JC. Metabolomics Standards Workshop and the development of international standards for reporting metabolomics experimental results. *Brief. Bioinform.* 2006 Jun;7(2): pp. 159-165.

[89] Liu M, Mao X, Ye C, Huang H, Nicholson JK, Lindon JC. Improved WATERGATE Pulse Sequences for Solvent Suppression in NMR Spectroscopy. *J. Magn. Reson.* 1999 5;132(1): pp. 125-129.

[90] Liu M, Farrant RD, Lindon JC, Nicholson JK. Two-dimensional 1H-1H and 13C-1H maximum-quantum correlation NMR spectroscopy with application to the assignment of the NMR spectra of the bile salt sodium taurocholate. *Magn. Reson. Chem.* 1999;33(3): pp. 212-219.

[91] Chan YCBS, Leung PS. Acute Pancreatitis: Animal Models and Recent Advances in Basic Research. *Pancreas* 2007 January;34(1): pp. 1-14.

[92] Wu G, Morris SM,Jr. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem. J* 1998 Nov 15;336 (Pt 1)(Pt 1): pp. 1-17.

[93] Morris SM,Jr. Arginine: beyond protein. *Am. J. Clin. Nutr.* 2006 Feb;83(2): pp. 508S-512S.

[94] Morris SM,Jr. Arginine metabolism: boundaries of our knowledge. *J. Nutr.* 2007 Jun;137(6 Suppl 2): pp. 1602S-1609S.

[95] Hegyi P, Rakonczay Z,Jr, Sari R, Gog C, Lonovics J, Takacs T, Czako L. L-arginine-induced experimental pancreatitis. *World J. Gastroentero.* 2004 Jul 15;10(14): pp. 2003-2009.

- [96] Czako L, Takacs T, Varga IS, Tizslavicz L, Hai DQ, Hegyi P, Matkovics B, Lonovics J. Involvement of oxygen-derived free radicals in L-arginine-induced acute pancreatitis. *Digest. Dis. Sci.* 1998 Aug;43(8): pp. 1770-1777.
- [97] Czako L, Takacs T, Varga IS, Hai DQ, Tizslavicz L, Hegyi P, Mándic Y, Matkovics B, Lonovics J. The pathogenesis of L-arginine-induced acute necrotizing pancreatitis: inflammatory mediators and endogenous cholecystokinin. *J. Physiology Paris* 2000 Jan-Feb;94(1): pp. 43-50.
- [98] Takacs T, Czako L, Morschl E, Laszlo F, Tizslavicz L, Rakonczay Z,Jr, Lonovics J. The role of nitric oxide in edema formation in L-arginine-induced acute pancreatitis. *Pancreas* 2002 Oct;25(3): pp. 277-282.
- [99] Fahey JW, Zalcmann AT, Talalay P. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry* 2001 Jan;56(1): pp. 5-51.
- [100] Daxenbichler ME, VanEtten CH, Wolff IA. (S)- and (R)-1-cyano-2-hydroxy-3-butene from myrosinase hydrolysis of epi-progoitrin and progoitrin. *Biochemistry* 1966 Feb;5(2): pp. 692-697.
- [101] Wallig MA, Kore AM, Crawshaw J, Jeffery EH. Separation of the toxic and glutathione-enhancing effects of the naturally occurring nitrile, cyanohydroxybutene. *Fund. Appl. Toxicol.* 1992 Nov;19(4): pp. 598-606.
- [102] Umemura T, Yamashiro S, Bhatnagar MK, Moody DL, Slinger SJ. Liver fibrosis of the turkey on rapeseed products. *Res. Vet. Sci.* 1977 Sep;23(2): pp. 139-145.
- [103] Martland MF, Butler EJ, Fenwick GR. Rapeseed induced liver haemorrhage, reticulolysis and biochemical changes in laying hens: the effects of feeding high and low glucosinolate meals. *Res. Vet. Sci.* 1984 May;36(3): pp. 298-309.
- [104] Verkerk R, Schreiner M, Krumbein A, Ciska E, Holst B, Rowland I, De Schrijver R, Hansen M, Gerhäuser C, Mithen R, Dekker M. Glucosinolates in Brassica

vegetables: The influence of the food supply chain on intake, bioavailability and human health. *Mol. Nutr. Food Res.* 2009;53(S2): pp. S219-S219.

[105] Wallig MA, Gould DH, Fettman MJ. Selective pancreato-toxicity in the rat induced by the naturally occurring plant nitrile 1-cyano-2-hydroxy-3-butene. *Food Chem. Toxicol.* 1988 Feb;26(2): pp. 137-147.

[106] Kelly L, Reid L, Walker NI. Massive acinar cell apoptosis with secondary necrosis, origin of ducts in atrophic lobules and failure to regenerate in cyanohydroxybutene pancreatopathy in rats. *Int. J. Exp. Pathol.* 1999 Aug;80(4): pp. 217-226.

[107] Bhatia M. Apoptosis versus necrosis in acute pancreatitis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2004 February 1;286(2): pp. G189-196.

[108] Cao Y, Adhikari S, Ang AD, Clement MV, Wallig M, Bhatia M. Crambene induces pancreatic acinar cell apoptosis via the activation of mitochondrial pathway. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2006 July 1;291(1): pp. G95-101.

[109] Adhikari S, Ramnath RD, Wallig M, Bhatia M. Role of mitogen-activated protein kinases in crambene-induced pancreatic acinar cell apoptosis. *Int. J. Integ. Biol.* 2008;3(1): pp. 25.

[110] Bhatia M, Wallig MA, Hofbauer B, Lee HS, Frossard JL, Steer ML. Induction of apoptosis in pancreatic acinar cells reduces the severity of acute pancreatitis. *Biochem. Biophys. Res. Co.* 1998 May 19;246(2): pp. 476-483.

[111] Wallig MA, Jeffery EH. Enhancement of pancreatic and hepatic glutathione levels in rats during cyanohydroxybutene intoxication. *Fund. Appl. Toxicol.* 1990 Jan;14(1): pp. 144-159.

[112] Holst B. A critical review of the bioavailability of glucosinolates and related compounds. *Nat. Prod. Rep.* 2004;21(3): pp. 425.

- [113] Beckonert O, Keun HC, Ebbels TM, Bundy J, Holmes E, Lindon JC, Nicholson JK. Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. *Nat. Protoc.* 2007;2(11): pp. 2692-2703.
- [114] MSI Board Members, Sansone SA, Fan T, Goodacre R, Griffin JL, Hardy NW, Kaddurah-Daouk R, Kristal BS, Lindon J, Mendes P, Morrison N, Nikolau B, Robertson D, Sumner LW, Taylor C, van der Werf M, van Ommen B, Fiehn O. The metabolomics standards initiative. *Nat. Biotechnol.* 2007 Aug;25(8): pp. 846-848.
- [115] Peakman TC, Elliott P. The UK Biobank sample handling and storage validation studies. *Int. J. Epidemiol.* 2008 Apr;37 Suppl 1: pp. i2-6.
- [116] Niederau C, Niederau M, Luthen R, Strohmeyer G, Ferrell LD, Grendell JH. Pancreatic exocrine secretion in acute experimental pancreatitis. *Gastroenterology* 1990 Oct;99(4): pp. 1120-1127.
- [117] Manso MA, San Roman JJ, de Dios I, Garcia LJ, Lopez MA. Cerulein-induced acute pancreatitis in the rat. Study of pancreatic secretion and plasma VIP and secretin levels. *Digest. Dis. Sci.* 1992 Mar;37(3): pp. 364-368.
- [118] Brunelli A, Scutti G. An ultrastructural study to investigate the effect of allopurinol on cerulein-induced damage to pancreatic acinar cells in rat. *Int. J. Pancreatol.* 1998 Feb;23(1): pp. 25-29.
- [119] Liu XH, Kimura T, Ishikawa H, Yamaguchi H, Furukawa M, Nakano I. Effect of endothelin-1 on the development of hemorrhagic pancreatitis in rats. *Scand. J Gastroentero.* 1995 Mar;30(3): pp. 276-282.
- [120] Dieterle F, Ross A, Schlotterbeck G, Senn H. Probabilistic quotient normalization as robust method to account for dilution of complex biological mixtures. Application in ¹H NMR metabonomics. *Anal. Chem.* 2006 Jul 1;78(13): pp. 4281-4290.

- [121] Nielsen NV, Carstensen JM, Smedsgaard J. Aligning of single and multiple wavelength chromatographic profiles for chemometric data analysis using correlation optimised warping. *J. Chromatogr. A* 1998 5/1;805(1-2): pp. 17-35.
- [122] Wong JW, Durante C, Cartwright HM. Application of fast Fourier transform cross-correlation for the alignment of large chromatographic and spectral datasets. *Anal. Chem.* 2005 Sep 1;77(17): pp. 5655-5661.
- [123] Veselkov KA, Lindon JC, Ebbels TMD, Crockford D, Volynkin VV, Holmes E, Davies DB, Nicholson JK. Recursive Segment-Wise Peak Alignment of Biological ¹H NMR Spectra for Improved Metabolic Biomarker Recovery. *Anal. Chem.* 2009 01/01;81(1): pp. 56-66.
- [124] Holmes E, Nicholls AW, Lindon JC, Ramos S, Spraul M, Neidig P, Nicholson JK. Development of a model for classification of toxin-induced lesions using ¹H NMR spectroscopy of urine combined with pattern recognition. *NMR Biomed.* 1998;11(4-5): pp. 235-244.
- [125] Antti H, Ebbels TMD, Keun HC, Bollard ME, Beckonert O, Lindon JC, Nicholson JK. Statistical experimental design and partial least squares regression analysis of biofluid metabonomic NMR and clinical chemistry data for screening of adverse drug effects. *Chemometr. Intell. Lab.* 2004/9/28;73(1): pp. 139-149.
- [126] Cloarec O, Dumas ME, Trygg J, Craig A, Barton RH, Lindon JC, Nicholson JK. Evaluation of the orthogonal projection on latent structure model limitations caused by chemical shift variability and improved visualization of biomarker changes in ¹H NMR spectroscopic metabonomic studies. *Anal. Chem.* 2005 Jan 15;77(2): pp. 517-526.
- [127] Trygg J. O2-PLS for qualitative and quantitative analysis in multivariate calibration. *J. Chemometr.* 2002;16(6): pp. 283-293.
- [128] Trygg J, Wold S. O2-PLS, a two-block (X-Y) latent variable regression (LVR) method with an integral OSC filter. *J. Chemometr.* 2003;17(1): pp. 53-64.

- [129] Bro R, Kjeldahl K, Smilde AK, Kiers HA. Cross-validation of component models: a critical look at current methods. *Anal. Bioanal. Chem.* 2008 Mar;390(5): pp. 1241-1251.
- [130] Cloarec O, Campbell A, Tseng L, Braumann U, Spraul M, Scarfe G, Weaver R, Nicholson JK. Virtual Chromatographic Resolution Enhancement in Cryoflow LC-NMR Experiments via Statistical Total Correlation Spectroscopy. *Anal. Chem.* 2007 05/01;79(9): pp. 3304-3311.
- [131] Zhang F, Bruschiweiler R. Robust deconvolution of complex mixtures by covariance TOCSY spectroscopy. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2007;46(15): pp. 2639-2642.
- [132] Simpson DP. Citrate excretion: a window on renal metabolism. *Am. J. Physiol.* 1983 Mar;244(3): pp. F223-34.
- [133] Hamm LL. Renal handling of citrate. *Kidney Int.* 1990 Oct;38(4): pp. 728-735.
- [134] Nicholson JK, Wilson ID. Opinion: understanding 'global' systems biology: metabonomics and the continuum of metabolism. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2003 Aug;2(8): pp. 668-676.
- [135] Keun HC, Ebbels TM, Bollard ME, Beckonert O, Antti H, Holmes E, Lindon JC, Nicholson JK. Geometric trajectory analysis of metabolic responses to toxicity can define treatment specific profiles. *Chem. Res. Toxicol.* 2004 May;17(5): pp. 579-587.
- [136] Boger RH, Bode-Boger SM. The clinical pharmacology of L-arginine. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2001;41: pp. 79-99.
- [137] Rohde CM, Wells DF, Robosky LC, Manning ML, Clifford CB, Reily MD, Robertson DG. Metabonomic evaluation of Schaedler altered microflora rats. *Chem. Res. Toxicol.* 2007 Oct;20(10): pp. 1388-1392.
- [138] Donaldson RM, JR. Excretion of tryptamine and indole-3-acetic acid in urine of rats with intestinal diverticula. *AJP - Legacy* 1962 February 1;202(2): pp. 289-292.

- [139] Smith EA, Macfarlane GT. Enumeration of human colonic bacteria producing phenolic and indolic compounds: effects of pH, carbohydrate availability and retention time on dissimilatory aromatic amino acid metabolism. *J. Appl. Bacteriol.* 1996 Sep;81(3): pp. 288-302.
- [140] Xu ZR, Hu CH, Wang MQ. Effects of fructooligosaccharide on conversion of L-tryptophan to skatole and indole by mixed populations of pig fecal bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 2002 Apr;48(2): pp. 83-90.
- [141] Olah A, Belagyi T, Issekutz A, Gamal ME, Bengmark S. Randomized clinical trial of specific lactobacillus and fibre supplement to early enteral nutrition in patients with acute pancreatitis. *Brit. J. Surg.* 2002 Sep;89(9): pp. 1103-1107.
- [142] Lasztity N. Effect of enterally administered n-3 polyunsaturated fatty acids in acute pancreatitis--a prospective randomized clinical trial. *Clin. Nutr.* 2005;24(2): pp. 198.
- [143] Mangiante G, Colucci G, Canepari P, Bassi C, Nicoli N, Casaril A, Marinelloa P, Signorettob C, Bengmarkc S. Lactobacillus plantarum reduces infection of pancreatic necrosis in experimental acute pancreatitis. *Digest. Surg.* 2001;18(1): pp. 47-50.
- [144] Muftuoglu MA, Isikgor S, Tosun S, Saglam A. Effects of probiotics on the severity of experimental acute pancreatitis. *Eu. J. Clin. Nutr.* 2006 Apr;60(4): pp. 464-468.
- [145] Bassi C, Mangiante G, Falconi M, Salvia R, Frigerio I, Pederzoli P. Prophylaxis for septic complications in acute necrotizing pancreatitis. *J. Hepatobiliary Pancreat. Surg.* 2001;8(3): pp. 211-215.
- [146] Besselink MG, van Santvoort HC, Buskens E, Boermeester MA, van Goor H, Timmerman HM, Nieuwenhuijs VB, Bollen TL, van Ramshorst B, Witteman BJM, Rosman C, Ploeg RJ, Brink MA, Schaapherder AFM, Dejong CHC, Wahab PJ, van Laarhoven JHM, van der Harst E, van Eijck CHJ, Cuesta MA, Akkermans LMA, GGooszen H. Probiotic prophylaxis in predicted severe acute pancreatitis: a

randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2008 Feb 23;371(9613): pp. 651-659.

[147] Hill JM, Morse PA, Jr., Gentry GA. Metabolism of Deoxycytidine, Thymine, and Deoxythymidine in the Hamster. *Cancer Res.* 1975 May 1;35(5): pp. 1314-1319.

[148] Sung K, Odinkova IV, Mareninova OA, Rakonczay Jr Z, Hegyi P, Pandol SJ, Gukovsky I, Gukovskaya A. Prosurvival Bcl-2 proteins stabilize pancreatic mitochondria and protect against necrosis in experimental pancreatitis. *Exp. Cell Res.* 2009 7/1;315(11): pp. 1975-1989.

[149] Mareninova OA, Sung KF, Hong P, Lugea A, Pandol SJ, Gukovsky I, Gukovskaya A. Cell death in pancreatitis: caspases protect from necrotizing pancreatitis. *J. Biol. Chem.* 2006 Feb 10;281(6): pp. 3370-3381.

[150] Rakonczay Z,Jr, Hegyi P, Dosa S, Ivanyi B, Jarmay K, Biczó G, Hracskó Z, Varga I, Karg E, Kaszaki J, Varró A, Lonovics J, Boros I, Gukovsky I, Gukovskaya A, Pandol SJ, Takács T. A new severe acute necrotizing pancreatitis model induced by L-ornithine in rats. *Crit. Care Med.* 2008 Jul;36(7): pp. 2117-2127.

[151] Biczó G, Hegyi P, Berczi S, Dosa S, Hracsko Z, Varga IS, Iványi B, Venglovecz V, Wittmann T, Takács T, Rakonczay Z. Inhibition of arginase activity ameliorates L-arginine-induced acute pancreatitis in rats. *Pancreas* 2010 Aug;39(6): pp. 868-874.

[152] Kong XY. Plasma miR-216a as a potential marker of pancreatic injury in a rat model of acute pancreatitis. *World J. Gastroentero.* 2010;16(36): pp. 4599.

11. Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés alapját képező közlemények:

1. Bohus E, Coen M, Keun HC, Ebbels TMD, Beckonert O, Lindon JC, Holmes EC, Noszal B, Nicholson JK. Temporal Metabonomic Modeling of L-Arginine-Induced Exocrine Pancreatitis. *J. Proteome Res.* 2008; 7(10): pp. 4435-4445.
2. Bohus E, Racz A, Noszal B, Coen M, Beckonert O, Keun HC, Ebbels TMD, Cantor GH, Wijsman JA, Holmes EC, Lindon JC, Nicholson JK. Metabonomic investigations into the global biochemical sequelae of exposure to the pancreatic toxin 1-cyano-2-hydroxy-3-butene in the rat. *Magn. Reson. Chem.* 2009; 47 Suppl 1: pp. S26-35.
3. Robinette SL, Veselkov KA, Bohus E, Coen M, Keun HC, Ebbels TMD, Beckonert O, Holmes EC, Lindon JC, Nicholson JK. Cluster analysis statistical spectroscopy using nuclear magnetic resonance generated metabolic data sets from perturbed biological systems. *Anal. Chem.* 2009; 81(16): pp. 6581-6589.

12. Köszönetnyilvánítás

Hálás köszönettel tartozom:

Témavezetőmnek, Dr. Noszál Béla egyetemi tanárnak, a Gyógyszerészi Kémia Intézet vezetőjének és a Gyógyszerésztudományi Kar dékánjának a témaválasztásért, munkám elindításáért és a befejezésig nyújtott támogatásáért.

Jeremy K. Nicholson professzornak, az Imperial College Department of Surgery and Cancer vezetőjének a belém fektetett bizalmáért, mellyel lehetővé tette, hogy Intézetének adatbázisát és saját fejlesztésű kemometriai szoftvereit a munkámhoz felhasználjam.

Az Imperial College Biomolecular Medicine tanszékének részéről köszönetet szeretnék mondani:

John C. Lindon professzornak kézirataim átnézéséért és szakmai jótanácsaiért.

Helyi témavezetőmnek, Dr. Muireann Coennek a mindennemű sokoldalú segítségéért.

Dr. Olaf Beckonertnek az ottani méréseknél nyújtott segítségéért.

Dr. Olivier Cloarec és Dr. Kirill A. Veselkov kemometrikusoknak türelmes magyarázataikért.

Dr. Jake M. Pearcenek a számítógépes háttér megteremtéséért.

A Gyógyszerészi Kémia Intézet volt és jelenlegi munkatársai közül köszönetet szeretnék mondani:

Dr. Béni Szabolcsnak és Dr. Szakács Zoltánnak az NMR mérések gyakorlatának megtanításáért.

Takácsné Dr. Novák Krisztina professzornak, Dr. Rácz Ákosnak és Dr. Mazák Károlynak az oktatási feladataim ellátásához nyújtott támogatásukért és tanácsaikért.

Az Intézet minden munkatársának a jó munkahelyi atmoszféráért.

Legnagyobb hálával Családomnak tartozom lelki és anyagi támogatásukért.