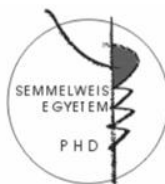


Kísérletes hasnyálmirigy-gyulladás mágneses magrezonancián alapuló metabonomikai elemzése

Doktori tézisek

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.

Semmelweis Egyetem, Gyógyszerészi Kémia Intézet
Budapest, 2011

1. Bevezetés

1.1. Metabonomika

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” – rendszerszemléletű vizsgálatát célozza. A metabonomika a biológiai folyadékok és szövetek kismolekula-összetételében - a különböző fiziológiás és patológias hatásokra - beálló kvantitatív és kvalitatív változások összetett mintázatát elemzi, majd ezen keresztül jellemzi a háttérben párhuzamosan zajló biokémiai és élettani folyamatokat.

A metabonomikai adatok gyűjtéséhez alkalmazott analitikai technikák közül az NMR spektroszkópia és a kromatográfias elválasztással kapcsolt tömegspektrometria terjedt el a legszélesebb körben, a mérések során kapott kiterjedt adattáblák elemzése pedig jellemzően többváltozós (“mintafelismerő”) statisztikai módszereket igényel. A metabonomika az elmúlt harminc évben sikeres kutatási stratégiának bizonyult egyebek mellett gyógyszergyári toxikológiai vizsgálatokban, diagnosztikában, funkcionális genomikai kísérletekben, táplálkozástudományban, epidemiológiai vizsgálatokban, stb., ám alkalmazása az orvostudományoktól távolabbi területeken is (pl. növénytan, környezetvédelem) legalább ennyire szerteágazó.

1.2. COMET kísérletsorozat

A COMET (Consortium for Metabonomic Toxicology) volt első olyan nagyobb lélegzetű kísérletsorozat, ahol a metabonomikában rejlő lehetőségeket részleteiben vizsgálták. A konzorciumot az Imperial College és hat gyógyszergyár hívta életre 1999-ben azzal a céllal, hogy a gyógyszergyári pre-klinikai kísérletek hagyományos méréseit metabonomikai vizsgálatokkal kiegészítve növeljék az állatkísérletek jóslóképességét, elsősorban a gyógyszerjelölt molekulák várható mellékhatás-profiljára vonatkozóan.

A prediktív rendszer létrehozásához referenciapontként először 147 ismert, vagy ismertnek vélt toxicitású modellvegyülettel végezték el a szigorúan standardizált méréseket. A legtöbb modellanyag máj- és vesekárosító hatású volt, mivel a gyógyszereknél ez a leggyakrabban jelentkező mellékhatás, de hasnyálmirigyre, húgyhólyagra, ivarszervekre stb. ható anyagok és általános fiziológiás stresszorok is megtalálhatók a listán.

2. Célkitűzések

2.1. A COMET kísérletsorozat exokrin pancreatitist előidéző modellanyagainak vizsgálata

L-arginin és 1-ciano-2-hidroxi-3-butén (CHB, krambén) modelltoxinokkal előidézett kísérletes exokrin hasnyálmirigy-gyulladás metabonomikai vizsgálatát végeztem Sprague-Dawley patkányokon, az állatok mintáinak kismolekula-összetétel változását 7 napon keresztül követve.

A kísérletek időtartama alatt folyamatosan gyűjtött vizeletminták és szérumminták ^1H NMR spektrumainak elemzését klinikai kémiai és hisztológiai vizsgálatokból származó adatok elemzésével egészítettem ki.

Munkám során különös figyelmet fordítottam az alábbi feladatokra és kérdéskörökre:

- A modellanyagok specifikus és általános hatásainak részletes metabonomikai leírása.
- A metabonomikai, szövettani, klinikai kémiai eredmények egységes biológiai értelmezése.
- Hatásmechanizmushoz köthető információk és biomarkerek keresése.
- Az anyavegyület főbb metabolikus útvonalainak feltérképezése, a metabolikus termékek szerepének vizsgálata a toxicitásban.
- A kísérleti állatok csoportjaiban a válaszadás diverzitásának vizsgálata.
- Az állatkísérletes modell előnyeinek/hátrányainak feltérképezése, az extrapolálhatóság korlátainak vizsgálata.

2.2. Klaszteranalízisen alapuló Statisztikai Spektroszkópia (CLASSY) fejlesztése és validálása

Célunk egy olyan felhasználóbarát adatelemző rendszer létrehozása volt, mely megnöveli az NMR spektrumokon alapuló metabonomikai vizsgálatoknál a statisztikai elemzés áteresztőképességét, és a széles körben elterjedt projekciós módszerekkel szemben nagyobb lehetőséget ad a metabolit koncentrációk időbeli változásainak szemléltetésére, így segítve az eredmények biológiai értelmezését.

3. Módszerek

3.1. Kísérlettervezés

Mintagyűjtés. A kísérleteket végző gyógyszergyárakban hím Sprague-Dawley patkányokat soroltak random módon kontroll (C), kis dózissal kezelt (LD) és nagy dózissal kezelt (HD) csoportokba. Az állatok egyszeri 10 ml/kg térfogatú injekciót kaptak az 1. táblázatban leírtak szerint.

Modellanyag	L-arginin			CHB (krambén)		
Adagolás	Intraperitoneális			szubkután		
Dóziscsoport	HD	LD	C	HD	LD	C
Állatok száma	20	10	10	10	10	10
Dózis (mg/kg)	4000	1000	Vehic.	150	15	Vehic.

Minden dóziscsoportban az állatok egyik felét a beadást követő 48. órában, a másik felét a 168. órában elaltatták. A vizeletmintákat frakciónként gyűjtötték a toxin beadása előtt 16 órával, majd azt követően az alábbi időpontokban: 0, 8, 24, 48, 72, 96, 120, 144, és 168 h. A szérummintákat az elaltatáskor gyűjtött vérből izolálták, ekkor mérték a testsúlyt valamint a vizsgált szervek súlyát, és ekkor vettek mintákat a máj, a vese és a hasnyálmirigy szövettani elemzéséhez is.

Klinikai kémiai és szövettani elemzés. A vizeletmintáknál mérték a minta térfogatát, ozmolalitását, pH-ját, fehérje és glükóz koncentrációját. A szérummintáknál meghatározták a kreatinin, urea nitrogén (BUN), alanin-aminotranszferáz (ALT), aszpartát-aminotranszferáz (AST), alkalikus foszfatáz (ALP), glükóz, nátrium, kálium, kalcium, foszfor, albumin, teljes fehérje és teljes bilirubin szintet. A szövetmintákat 10% formalinnal történő fixálás után paraffinba ágyazták, a metszeteket hematoxilinnal és eozinnal festették.

1D NMR spektroszkópia. Az Imperial Collage technikusai 400 μ l vizeletmintához 200 μ l (TSP-t és nehézvizet is tartalmazó) nátrium-foszfat puffert adtak. Az ^1H NMR spektrumokat 600 MHz-es készüléken vették fel az alábbi pulzusszekvenciával: $rd - 90^\circ - 3 \mu\text{s} - 90^\circ - 100 \text{ ms} - 90^\circ - \text{acq}$. A szérummintáknál felolvasztás, keverés és 10 perc állás után a felülúszóból 200 μ l-t 400 μ l 20% D_2O -t tartalmazó fiziológiás sóoldathoz adtak, majd centrifugálás után 500 μ l felülúszót különítettek el a méréshez. Az ^1H NMR spektrumokat szintén 600 MHz-es készüléken a Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) spin-echo pulzusszekvencia felhasználásával vették fel: $rd - 90^\circ - (t - 180^\circ - t)_n - \text{acq}$, ahol $n=80$ és $t=400 \mu\text{s}$.

3.2. NMR spektrumok statisztikai elemzése

Az ^1H NMR spektrumokat MATLAB (R2006b és R2008a verzió) szoftverbe importáltam, és a víz ($\delta=4,7\text{-}4,9$ ppm), a TSP ($\delta=-0,2\text{-}0,2$ ppm), valamint a karbamid ($\delta=5,6\text{-}6,0$ ppm) jeléhez tartozó régiókat kivágtam. Többféle normalizálást használtam. A PQN normalizálásnál az anyavegyület és metabolitjainak jeleit nem vágtam ki, és a kémiai eltolódást jellemzően RSPA szoftverrel igazítottam. A másik adatkészleten kivágtam a modellanyag és metabolitjainak jeleit és a spektrumokat teljes területre normalizáltam. Eredményeimet mindkét adatkészleten ellenőriztem.

Ortogonalis PLS diszkriminancia analízis (O-PLS-DA). Az O-PLS-DA egy projekción alapuló diszkriminancia analízis, melynél a csoportokhoz való tartozástól független szisztematikus változások előzetes szűrésével a modell jóslóképesége és főleg értelmezhetősége nagyban javul. Az általam használt, NMR spektrumok analíziséhez továbbfejlesztett változat az elemző munkáját a PLS-együtthatók speciális grafikus megjelenítésével is segíti. A modellek túligazítottóságának elkerüléséhez hétszempensű keresztvalidálást alkalmaztam.

Statisztikai Totál Korrelációs Spektroszkópia (STOCSY). A módszer a kísérlet során gyűjtött spektrumok jeleinek korreláltságát vizsgálja, és szűri a mintáról mintára konzisztensen együtt, egy irányba és azonos mértékben változó jeleket. A STOCSY egydimenziós változatánál az elemzőnek ki kell választania azt a csúcst, amelynek a többi jelhez fűződő kapcsolata érdeklí őt. Mivel a jelek közötti korreláció akkor a legerősebb, ha azok egy és ugyanazon kismolekulához tartoznak, az eredményként kapott ábrán - mely szerkezetét tekintve a vizsgált biológiai minta spektruma - a piros szín árnyalataiban kirajzolódik annak a kismolekulának az ^1H -NMR spektruma, amelyhez a választott csúcs tartozik s így könnyű annak asszignálása. A STOCSY elemzést O-PLS módszerrel kombinálva a jelekhez tartozó kismolekulák biokémiai kapcsolatai is vizsgálhatók.

Főkomponens-analízis (PCA). A PCA egy nem-felügyelt (nem-irányított) mintafelismerő adatelemző módszer, mely az eredeti változók lineáris kombinációjaként kapható ortogonalis látens változók keresésén alapul. A főkomponens ábra két vagy három dimenzióban mutatja a minták csoportokba rendeződését, a vele átfedésbe hozható főkomponens-együttható ábra pedig a minták elkülönüléséért/hasonlóságáért felelős spektrális információt jeleníti meg. A módszer használatához célszerű az NMR spektrumokat 0,04 ppm széles szegmensekre bontani, és a víz, a TSP, valamint a karbamid jeleit eltávolítani. Röppályaelemzésnél a különböző dóziscsoportokhoz és különböző időpontokhoz tartozó minták átlagértékét ábrázoljuk.

3.3. Klaszteranalízisen alapuló Statisztikai Spektroszkópia (CLASSY)

A CLASSY kétféle csoportelemző algoritmus (DemixC és HCA) kombinálásával egyrészt azonosítja a szerkezeti okokból korrelált spektrális csúcsok csoportjait, másrészt klaszterezi azokat a kismolekulákat, melyek koncentrációváltozásának időbeli lefolyása hasonlóságot mutat, és ezért vélhetően azonos biokémiai/élettani folyamatokhoz köthető a mennyiségi változásuk a mintákban. A klaszterezett korrelációk ábrájának diagonálisában lévő blokkok egy-egy adott kismolekula NMR csúcsai, így a blokkokhoz tartozó kémiai eltolódás értékek megkönnyítik a csúcsok asszignációját. A csoportba rendeződés következő szintje a biokémiai/élettani kapcsolatokat mutatja. A dóziscsoportok “heat map” ábráinak vízszintes sorai az állatok mintáinak NMR spektrumai időpontok szerinti bontásban, a függőleges oszlopok azonban megfelelnek a klaszterezett korrelációk ábra oszlopainak, tehát a kismolekulák jelei nem a kémiai eltolódás skálán lévő pozíciójukban, hanem a csoportelemzésnek megfelelő helyükön jelennek meg. Az ábrákon logaritmusos léptékű színskála jelöli, hogy a kontrollhoz képest a jelintenzitás az adott spektrumban nőtt, vagy csökkent.

4. Eredmények, következtetések

4.1. L-argininnel előidézett exokrin hasnyálmirigy-gyulladás

A kis dózissal kezelt állatok csoportja a válaszadás erőssége szempontjából egységesnek mutatkozott mind a szövettani és klinikai kémiai, mind a metabonómiai vizsgálatok alapján. A nagy dózissal kezelt állatok közül kettő 24 órával az injekció beadása után elpusztult (őket *erős válaszadóknak* tekintetem), míg három kísérleti állat meglepő rezisztenciát mutatott az arginin-toxicitással szemben (*gyenge válaszadók* csoportja). A fenti csoportok klinikai kémiai adatait és szérum valamint vizelet spektrumait a statisztikai elemzéskor külön vizsgáltam a *normál válaszadók* ($n=15$) csoportjától. Az eredmények ismertetésénél a továbbiakban a nagy dózissal kezelt HD csoport alatt csak a *normál válaszadókat* értem.

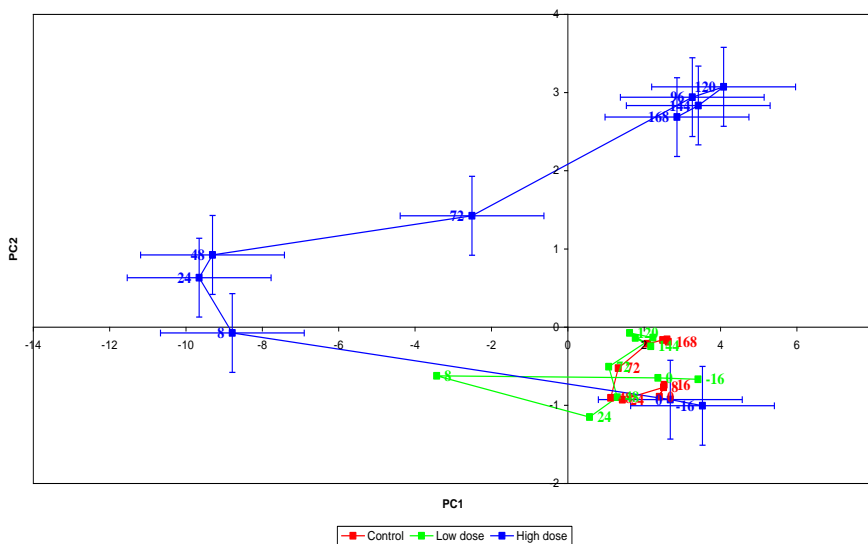
Szövettan. A kis dózissal kezelt állatok máj-, vese- és hasnyálmirigy-szöveteinek sejtes szerkezete minden vizsgált időpontban normális volt. A nagy dózissal kezelt állatok hasnyálmirigy szöveteiben a 48. órában a zimogén granulomok számának jelentős/súlyos csökkenését és közepes/jelentős mértékű acináris atrófiát, intersticiális ödémát, és gyulladást lehetett megfigyelni. 168 órával az injekció beadása után a zimogén granulomok majdnem teljes hiánya és súlyos atrófia volt jellemző a szövetekre, ugyanakkor regenerálódásra utaló morfológiai jegeket is lehetett látni.

Klinikai kémiai mérések és súlyadatok. A nagy dózissal kezelt csoportban a szöveti ödémának köszönhetően a 48 óra után elaltatott állatokban a pankreász és az agy súlyának aránya a kontrollhoz képest magas volt, míg a 168 óra után elaltatott állatoknál 61%-os csökkenést lehetett megfigyelni, mely a jelentős szöveti atrófia következménye. Az arginin-hidroklorid só beadása dóziszfüggő metabolikus acidózis kialakulásához vezetett, a vizelet pH-ja legalacsonyabb értékét (pH=5.5-6.0) a HD csoport 24-48 h mintáiban érte el. A HD csoport további jellemzői közül a legfontosabbak: a) fokozott fehérje ürítés a vizeletbe 24 és 48 óránál, ami a kontroll szint alá csökkent a késői időpontokban. b) emelkedett glükóz koncentráció a vizeletben a 8-72 h mintákban. c) emelkedett szérumszint 24 óránál, mely a 48. órára regenerálódott. d) emelkedett szérumszint 24 órával az injekció beadása után, mely jól mutatja a nagy mennyiségű arginin közvetlen hatását az urea-ciklusra. A BUN a 48. órás szérumszintekben visszatért a normális szintre, majd a 168. órás mintákban a kontrollhoz képest csökkenést mutatott. Ez utóbbi a 168. óránál mért alacsony szérumszinttel együtt az exokrin hasnyálmirigy csökkent működéséből adódó elégtelen fehérje-emésztés következménye lehet.

Metabonomikai elemzés. A vizeletminták kismolekula-összetételének változásában megfigyelhető időbeli és korrelációs mintázat alapján a patológiás folyamatot öt fő eseményre tudtam bontani (1. és 3. ábra). a) A keringésbe jutó nagy mennyiségű argininre adott közvetlen válasz, melyet az urea-ciklus és a transzaminálási folyamatok gyorsulása jellemezett (pl. emelkedett arginin, ornitin, citrullin, glutaminsav és glutamin szint). b) Az aminosav-lebontás zavara, mely egyes aminosavak (pl. valin, leucin, izoleucin, alanin) vizeletbe történő közvetlen ürítését eredményezte. c) Enyhe átmeneti endokrin toxicitás (emelkedett glükóz és tejsav szint). d) Metabolikus acidózis kialakulása (jelentős csökkenés pl. citrátkör-intermedierek esetében). e) A bélflóra összetételének és működésének átmeneti változása 24-72 h között (fenil-acetil-glicin mennyiségének emelkedése, krezol-metabolitok megjelenése). Az arginin vizelet-összetételt befolyásoló hatása dóziszfüggő volt, az LD csoportban csak az a) és d) folyamatokhoz köthető jegeket lehetett látni, és az állatok a 24. órára regenerálódtak (1. ábra). A *gyenge válaszadók* arginin ürítése időben elhúzódott és a vizelet ornitin tartalma is arányaiban alacsonyabb volt, így az arginin toxicitással szembeni rezisztenciájuk legvalószínűbb oka az argináz enzim alacsony aktivitása.

Az L-arginin ip. injekcióján alapuló 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 hasnyálmirigyen kívül egyéb szervet, ugyanakkor, mivel a modellanyag központi szerepet játszik számos

biokémiai folyamatban, korai hatásként számolni kell azzal, hogy kiterjedt zavar áll elő alapvető anyagcsere-útvonalakon is. A kísérleti állatok relatív magas halálozási arányának feltételezésünk szerint a kialakuló metabolikus acidózis az oka. 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.



1. ábra. Röppályaelemzés ábra az L-argininnel végzett kísérletben gyűjtött vizeletminták spektrumai alapján. A piros a kontroll, a zöld a kis dózissal kezelt (LD), a kék a nagy dózissal kezelt (HD), *normál válaszadó* állatok átlagértékeit és útvonalát jelöli. A számok a modellvegyület beadásához képest eltelt órákat mutatják. A 8 h minták a HD és az LD csoportban ugyanabba az irányba mozdultak el, de az elmozdulás mértéke dóziszfüggő volt. Az LD minták 24 óra után visszatértek a kiindulási területre, tehát az állatok regenerálódtak. A HD állatok mintái az alapvető biokémiai funkciókban, bélflóra működésben, és hasnyálmirigy funkcióban beálló zavar következtében újabb régiókat foglaltak el a virtuális metabolikus térben. Röppályájuk nyitott maradt, jelezve, hogy a szervezetük a kísérlet időtartama alatt nem nyerte vissza kiindulási egyensúlyát, bár állapotuk stabilizálódott.

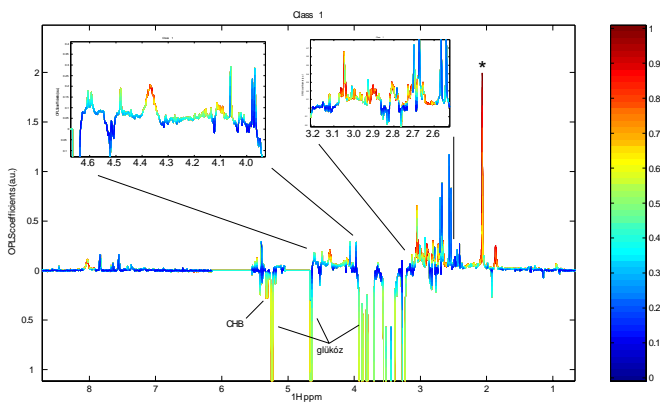
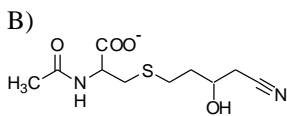
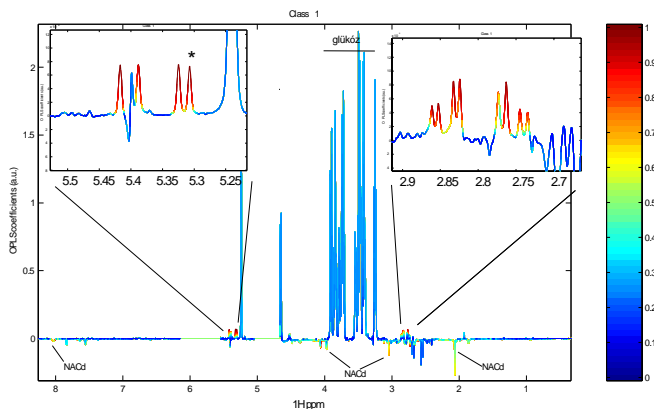
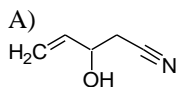
4.2. 1-ciano-2-hidroxi-3-buténnel előidézett exokrin hasnyálmirigygyulladás

Szövettan. A nagy dózissal kezelt állatok csoportjánál a hasnyálmirigy szöveteken megfigyelhető elváltozások összhangban álltak az irodalomban megtalálható korábbi kísérletek eredményeivel. A 48 óránál elaltatott állatoknál az acináris sejtek enyhe/közepes mértékű diffúz atrófiáját és apoptózisra utaló jeleket lehetett látni. Emellett a zimogén granulomok számának közepes/jelentős mértékű csökkenése, intersticiális ödéma, és enyhe szöveti gyulladás volt jellemző. Hasnyálmirigy enzimek felszabadulása következtében kialakuló szöveti 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 enyhe fibrózist lehetett megfigyelni.

Klinikai kémiai mérések és súlyadatok. A HD csoport állatainak átlagos testsúlya a kontroll állatokéhoz képest 17%-kal maradt el a 48. órában, és 18%-kal a 168. órában. 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). Megjegyzendő, hogy az utóbbi csoport állatainak belei kivétel nélkül puffadtak voltak és emésztetlen táplálékot tartalmaztak. A HD csoport további jellemzői közül a legfontosabbak: Enyhén savas vizelet az első 24 órában; emelkedett glükóztartalom 8 óránál, mely nagy egyéni szórást mutatott és a 48. órára regenerálódott (endokrin funkció átmeneti zavara); kontrollnál magasabb szérum amidáz szint 24. óránál, mely azonban statisztikailag nem szignifikáns és biológiailag sem értelmezhető.

Metabonomikai elemzés. A vizelet NMR spektrumainak STOCSY elemzése alapján a CHB, valamint egy fő és két minor metabolitjának a jeleit tudtam azonosítani a mintákban. A kémiai eltolódás és a csatolási mintázat alapján a fő metabolit egy *N*-acetyl-ciszteinnel konjugált telített származék (2. ábra).

A nagy dózissal kezelt állatok jelentős mértékű súlyvesztése miatt ebben a kísérletben számolni kellett azzal, hogy a kismolekula-összetétel változása részben az injekciót követő kezdeti étvágytalanság, majd az elégtelen emésztés következménye lehet. A citrátkör-intermedierek, a *transz*-akonitsav és az *N*-metil-nikotinsav szintjében megfigyelhető csökkenés ezért nem tekinthető specifikus markereknek. A hatásmechanizmus megértése szempontjából ugyanakkor jelentősége lehet a 2'-deoxiciditin korai időpontokban (8 h és 24 h) mindkét dóziscsoportban látható konzisztens emelkedésének.

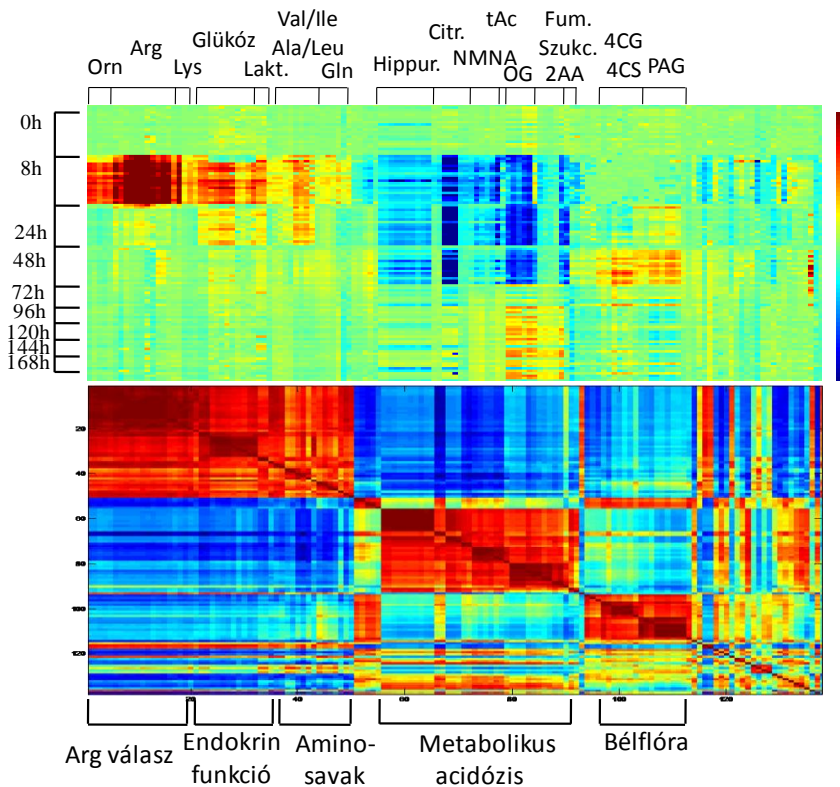


2. ábra. A nagy dózissal kezelt állatok ($n=10$) 8. órában gyűjtött vizeletmintáinak ^1H NMR spektrumai alapján készült 1D STOCYSY ábrák. Modelltoxin: CHB. A) Kiindulási csúcs az 1-cyano-2-hidroxi-3-butén (CHB) jele $\delta=5,32$ (*) B) Kiindulási csúcs a teltett CHB származék *N*-acetil-cisztein konjugátumának jele $\delta=2,07$ (*)

4.3. Klaszteranalízisen alapuló Statisztikai Spektroszkópia (CLASSY) fejlesztése és validálása

A CLASSY-módszer az eredmények megbízhatóságának megtartása mellett növeli a spektrális adatok statisztikai elemzésének áteresztőképességét és csökkenti az interpretálására fordítandó időt és energiát. A validálás során megbizonyosodtunk arról, hogy más módszereknél gyorsabban teszi lehetővé a kísérlet szempontjából fontos, változásokat mutató kismolekulák körének szűrését, és hatékony segítséget nyújt a spektrum jeleinek asszignációjához, a kémiai szerkezetek megállapításához is. A különböző szinteken korrelált jelek csoportosítása útján könnyebbé válik a kismolekulák bonyolult biokémiai, élettani kapcsolatainak felderítése. A kvantitatív spektrális információ megjelenítésével gyorsan, átfogó képet lehet formálni a kísérletről: ellenőrizhető a kontroll csoport megbízhatósága, a folyamatok dóziszfüggése, a kismolekulák mintabeli szintjének időbeli változásai pedig jól követhető formában, szemléletesen tárulnak az elemző szeme elé. A grafikus megjelenítés segíti az egyedi válaszadók azonosítását és azoknak az alcsoportoknak az elkülönítését, ahol a válaszadás mértékében vagy időbeli lefolyásában vannak eltérések.

A jelek azonosítása után a CLASSY ábrák értelmezése nem igényel jártasságot sem az NMR spektroszkópia, sem a többváltozós adatelemzés területén, így az eredményeknek ez a megjelenítési formája alkalmas arra, hogy segítségével a kutatók mind szélesebb körét vonjuk be 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.



3. ábra. CLASSY ábrák az argininnel végzett kísérlet vizeletmintáinak ^1H NMR spektrumai alapján. A felső a HD csoport “heat map” ábrája, mely a minták metabolitkoncentráció-változásainak időbeliségét mutatja a kontrollhoz képest. Az alsó a klaszterezett korrelációk ábrája, ahol a szerkezetileg korrelált jelek csoportjai és a biokémiai/élettani okokból korrelált kismolekulák klaszterei jelennek meg. 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; Szukc., borostyánkősav; 2AA, 2-amino-adipinsav; 4CG, 4-krezol-glükuronid; 4CS, 4-krezol-szulfát; PAG, fenil-acetil-glicin.

5. Az értekezés alapját képező közlemények

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. *Journal of Proteome Research* 2008; 7(10): pp. 4435-4445.

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. *Magnetic resonance in chemistry* 2009; 47 Suppl 1: pp. S26-35.

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. *Analytical Chemistry* 2009; 81(16): pp. 6581-6589.