

A fogászatban széles körben alkalmazott tömőanyagok biológiai hatásai

A TEGDMA mitokondriális toxicitásának kísérletes vizsgálata

Doktori tézisek

Dr. Mikulás Krisztina Ágnes

Semmelweis Egyetem

Klinikai orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Tretter László, D.Sc., egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Tóth Zsuzsanna, egyetemi docens, Ph.D.
Dr. Wunderlich Lívius, egyetemi adjunktus, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Dobó-Nagy Csaba, D.Sc., egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Végh András, egyetemi magántanár, Ph.D.
Dr. Kardon Tamás, egyetemi adjunktus, Ph.D.

Budapest

2019

BEVEZETÉS

Az emberi élettartam folyamatos növekedése és a populáció egyre idősebbé válása miatt időtálló, biokompatibilis anyagokra van szükség a fogorvoslásban. A hiányzó fogszövetek és a fogak pótlására felhasznált anyagok sajnos még mindig nem felelnek meg mindenben az elvárásoknak. A direkt restauratív anyagok mechanikai tulajdonságai, biokompatibilitása és adhézioja a fogszövetekhez általában nem ideális, további fejlesztésre szorul. 2013-ban az ENSZ Környezetvédelmi Programjában hangsúlyozta a higany embert körülvevő környezetre gyakorolt káros hatását. Az Európai Unió 2017 májusában fogadta el a Minamata Egyezményen alapuló, higanyra vonatkozó rendeletét, amely a fogászati amalgám kivezetését szabályozza. Munkámban az üvegeionomer cementek és a műgyanta bázisú, esztétikus kompozitok ismertetése kapcsán tárgyalom a lehetséges amalgám alternatívák előnyös és hátrányos tulajdonságait.

A kompozitok rezin bázisú restauratív anyagok, amelyek a fogászatban nélkülözhetetlen szerepet játszanak a fog keményszöveteinek funkcionális és élethű esztétikai helyreállításában. A kompozíciós tömőanyagok szervesen töltőanyagokból (pl. kvarc, kerámia, lítium-alumínium szilikát részecskék stb.), szerves rezin mátrixból (pl. A-glicidil dimetakrilát (Bis-GMA), hidroxietil-metakrilát (HEMA), uretán-dimetakrilát (UDMA), (trietilén-glikol-dimetakrilát (TEGDMA))), és a kettő közötti kötést biztosító szilánfázisból állnak. A fogászatban széleskörűen alkalmazott rezin monomerek elegye (Bis-GMA, TEGDMA, HEMA, UDMA) jó mechanikai tulajdonságokat, gyors polimerizációt, könnyű kezelhetőséget és zománchoz való rögzülést tesz lehetővé például az esztétikus tömőanyagokban, a bondrendszerekben, a rögzítő cementekben. A viszkozitás csökkentése céljából alacsony molekulásúlyú, hígító komonomert, TEGDMA-t adnak az esztétikus tömőanyagokhoz, amely lehetővé teszi a töltőanyag koncentráció növelését. A TEGDMA előfordulási gyakorisága a kompozitokban, a rezin bázisú üvegeionomer cementekben és a bond rendszerekben magas, 25-50%. Nagyobb mennyiségben nemkívánatos tulajdonsága a polimerizációs zsugorodás fokozása, amelynek következménye a tömés élettartamának csökkenése. A polimerizáció során térhálós polimer keletkezik, aminek következtében csökken a molekulák közti távolság és ez zsugorodáshoz vezet. Ennek hatására belső feszülés és stressz alakulhat ki az anyagban, az üregbe való adhezív rögzítés során. Ez deformációt, széli résképződést és mikrorepedéseket okozhat a restaurációkban. A polimerizációs zsugorodás lehet a fő oka a posztoperatív fájdalomnak, a mikrorepedéseknek, a restauráció és a fog felszíne között kialakuló mikro résznek, ami kedvez a szekunder caries kialakulásának. A

polimerizáció sosem tökéletes és mindig maradhatnak telítetlen reziduális monomerek, amelyeknek a felszabadulása és kioldódása a tömés elkészítése után is jellemző a biodegradáció és az erózió kapcsán. Az elkészült kompozit tömésekben maradó, nem reagált monomerek csökkenthetik az anyagok klinikai tartósságát, oxidáció és hidrolitikus lebomlásuk révén a tömések elszíneződését és kopását fokozhatják.

A fogászati anyagok biokompatibilitása az utóbbi évtizedekben egyre nagyobb érdeklődést keltett a nemzetközi irodalomban. A kompozitok elmúlt időszakban való jelentős fejlődése ellenére megkérdőjelezhető a biokompatibilitásuk, amelynek oka az elégtelen polimerizáció mellett a hosszú távú kémiai és biológiai degradációjuk. A koleszterin-észteráz és a pszeudokolinészteráz képesek lebontani a kompozit tömőanyagok monomer alkotórészeit, amelyek ezután metakril molekulák felszabadulását eredményezhetik. A kompozitokból felszabaduló BisGMA és a TEGDMA bomlástermékei megváltoztathatják *S.* mutans proliferációját és anyagcseréjét, így elősegíthetik a biofilm képződését. A polimerizációs zsugorodás, a kioldódó metakrilát monomerek (TEGDMA, UDMA, HEMA, Bis-GMA stb.) és a kompozitok degradációja (kémiai, mechanikai, enzimatis, fényhatásra és hőhatásra kialakuló) felelősek a fő klinikai hátrányokért. A fogászati anyagok kapcsán végzett biokompatibilitásra irányuló kutatások száma napjainkban egyre nő, amelyek leggyakrabban *in vitro* citotoxicitást és genotoxicitást vizsgáló módszerek. A téma releváns; egyre fokozódik az érdeklődés az irodalmi adatok kapcsán nemcsak a kutatókban, hanem a fogorvosok körében is.

Az inkomplett polimerizációnak köszönhetően reziduális monomerek (TEGDMA, HEMA) szabadulnak fel milimoláris mennyiségben a pulpában és a nyálban, amelyek kapcsolatba léphetnek a szájüregi szövetekkel és bekerülhetnek a gasztrointesztinális rendszerbe. A monomerek a dentinen keresztül befolyásolhatják a pulpa sejtek működését. A monomerek és a kompozitok számos összetevője esetén felmerül az allergia szerepe a káros hatások hátterében. A szabad monomerek előfordulása az emberi szervezetben azonban elenyésző koncentrációjú és nem mutatható ki szisztémás káros hatás az allergiától eltekintve. A legtöbb tanulmány a rezin összetevőknek a sejtek alapvető funkcióira való hatását vizsgálta: pl. a sejtproliferációt, az enzimaktivitások gátlását, a sejtmembrán integritását, a sejt metabolizmusát (DNA-, RNA- és a fehérje szintézist), a sejt életképességét, a genotoxicitást és az ösztrogénszerű hatásokat stb.

A TEGDMA amfifil jellegű molekula, amely a legnagyobb arányú kioldódással rendelkezik a rezin monomerek között. A dentin vastagságától és a polimerizálódás minőségétől függően a TEGDMA akár a 4mM-t is elérheti a nyálban és a pulpában. A klinikailag manifesztálódó kontakt allergiáktól eltekintve a monomerek szisztémás, vérben való jelenléte az előbb említetteknel nagyságrendekkel alacsonyabb, ezért a TEGDMA hatására bekövetkező szisztémás mellékhatások valószínűleg elhanyagolhatók. A szájüregben a TEGDMA és a HEMA különböző sejtfunkciókat és a sejtek életképességét befolyásolja. A TEGDMA befolyásolhatja a sejtek metabolikus állapotát, DNS károsodást, nekrozist és apoptózist okozhat. Korábban arról számoltak be, hogy a TEGDMA a sejtekben stressz választ indíthat el, fokozza a reaktív oxigén származékok (ROS) képzését és az eukarióta sejtekben glutation (GSH) depléciót okozhat in vitro. A TEGDMA genotoxikus és mutagén hatásai valószínűleg a ROS képzés okozta DNS-károsodások következményei, mivel a toxikus hatások eliminálhatóak voltak számos kísérletben antioxidánsok jelenlétében. Kimutatták, hogy a TEGDMA apoptózist vagy nekrotikus sejthalált is okozhat, az alkalmazott koncentrációtól függően. Számos tanulmány bizonyítja, hogy a monomer okozta apoptózis a ROS képzés okozta oxidatív stresszel van összefüggésben.

Mindezek az eredmények a ROS központi szerepét feltételezik a TEGDMA citotoxicitásának és genotoxicitásának hátterében és a sejthalálához vezető útvonalak kiváltásában. Ezek a nemzetközi eredmények felvetik egy olyan közös mechanizmus és talán olyan molekuláris célpont lehetőségét a TEGDMA citotoxikus hatásának hátterében, amely felelős lehet a leírt celluláris hatásokért. Tekintettel arra, hogy az apoptózisban, a sejtek életképességének meghatározásában, a ROS képzésben és eliminálásban a mitokondriumoknak nagyon fontos szerepük van, logikusnak látszik, hogy a TEGDMA toxicitásában mitokondriális célpontokat keressünk. Figyelembe véve, hogy a mitokondriális károsodás lehet primer vagy szekunder, és ez a különbség nem mindig egyértelműen vizsgálható sejtes rendszerekben, ezért izolált mitokondriumokat választottunk a vizsgálataink középpontjába. Feltételezésünk szerint a TEGDMA legtöbb toxikus hatása a kedvezőtlen bioenergetikai paraméterekre és a ROS-termelés fokozódásra vezethető vissza. Valószínű, hogy a mitokondriális diszfunkciók felelősek a nekrotikus vagy apoptotikus sejthalálért.

Kutatásaink során a TEGDMA alacsony milimólos koncentrációit alkalmaztuk az izolált agyi mitokondriumokon, és a mitokondriumok legfontosabb bioenergetikai funkcióit a mitokondriális H_2O_2 homeosztázis (H_2O_2 termelés és elimináció) mérésével párhuzamosan értékeltük. Feltételezésünk szerint a mitokondriális légzési láncban a Komplex I (CI) gátlása felelős a TEGDMA legtöbb citotoxikus hatásáért.

CÉLKITŰZÉSEK

Az amalgám kivezetése nagyon aktuális téma napjainkban. Dolgozatom elején megpróbáltam választ keresni a lehetséges tömőanyag alternatívákat illetően, amelyek közül napjainkban a rezin bázisú kompozitok felhasználása terjedt el széleskörűen Magyarországon. A kompozitok biodegradációja miatt az anyag mechanikai tulajdonságai, biokompatibilitása még ma sem tökéletes, további fejlesztésre szorul. A kompozitok számos alkotóelemet tartalmaznak, ami miatt nagyon nehéz megítélni a toxicitásuk háttérében álló mechanizmusokat, amelyet az irodalomban *in vitro* körülmények között vizsgáltak a legtöbb esetben gingivális fibroblasztokon.

Munkám célja a kompozitokból legnagyobb arányban kioldódó TEGDMA rezin monomer nemzetközi irodalomban leírt citotoxikus és genotoxikus hatásainak háttérét megvizsgálni, mivel még mindig kevés adat áll rendelkezésre a TEGDMA citotoxikus mechanizmusának pontos megértésére. Az irodalomban leírt káros hatások, a ROS-termelés fokozódás, a feltételezett ROS okozta DNS károsodás és az apoptózis háttérében közös célpontot feltételeztünk. Tekintettel arra, hogy az apoptózisban, a sejtek életképességének meghatározásában, a ROS képzésben és eliminálásban a mitokondriumoknak nagyon fontos szerepük van, logikusnak látszott a TEGDMA toxicitásában mitokondriális célpontokat keresni. Feltételezésünk szerint a TEGDMA legtöbb toxikus hatása a kedvezőtlen bioenergetikai paraméterekre és a ROS-termelés fokozódásra vezethető vissza. Ezért kísérleteinkben izolált agyi mitokondriumokon vizsgáltuk meg a TEGDMA bioenergetikai hatásait és vele párhuzamosan a ROS homeosztázist. Megvizsgáltuk a TEGDMA hatását a mitokondriális O_2 fogyasztásra és a membránpotenciálra NADH- illetve $FADH_2$ -függő légzési szubsztrátok jelenlétében. Ezzel párhuzamosan kísérleteinkben tanulmányoztuk a TEGDMA hatását a ROS termelésre, miközben az eliminációt is figyelemmel kísértük. A TEGDMA ATP szintézisre és GSH szintre kifejtett hatását szintén vizsgáltuk kutatásunk során. Kísérleteink során a következő kérdéseket szeretnénk volna megválaszolni:

- I. Hogyan befolyásolja a TEGDMA az izolált agyi mitokondriumokon (*in vitro*) végzett kísérletekben a mitokondriális O_2 fogyasztást CI- illetve CII-függő (NADH-függő illetve $FADH_2$ -függő szubsztrátok) légzési szubsztrátok esetén?
- II. Az O_2 fogyasztás vizsgálataival párhuzamosan a TEGDMA hogyan hat a mitokondriális membránpotenciálra ($\Delta\psi_m$)?

III-IV.

Hogyan változik TEGDMA jelenlétében a mitokondriális H_2O_2 termelés és NAD(P)H szint CI- illetve CII-függő szubsztrátok jelenlétében?

Kölcsönhatásba léphet-e a TEGDMA közvetlenül a glutationnal (GSH) nem biológiai rendszerben?

V. Milyen hatással van a TEGDMA az ATP szintézisre?

VI. Direkt vizsgálat alátámasztja-e, hogy a TEGDMA gátolja a CI aktivitást?

MÓDSZEREK

A méréseink során felhasznált mitokondriumok izolálása tengeri malac agykéregből történt Percoll grádiens alkalmazásával, differenciált centrifugálással. A tengerimalacok tartását és eutanáziáját a Semmelweis Egyetem Állatkísérleti Bizottságának előírása szerint végeztük.

I. A mitokondriális O₂ fogyasztás mérése

A mitokondriális légzést Oxygraph-2k Clark-típusú polarográfiás oxigénelektóddal mértük (Oroboros Instruments, Innsbruck, Ausztria). Az oxigén elektródokat telített oxigénkoncentráció esetén és nulla oxigén koncentrációval kalibráltuk. A mérések során 0.5, 1.0, 2.0 és 5 mM TEGDMA koncentrációkat alkalmaztunk, kontroll vegyületként dimetil-szulfoxidot (DMSO) adtunk a kísérleteink során.

II. A mitokondriális membránpotenciál mérése ($\Delta\psi_m$)

A mitokondriális membránpotenciált ($\Delta\psi_m$) Safranin O fluoreszcens festékkel (2 μ M) detektáltuk. A safranin lipofil kationos festék, amely a membránpotenciálnak megfelelően oszlik meg a mitokondrium belső membránjának két oldalán. A fluoreszcenciát 37 °C-on, 495 és 585 nm-es excitációs és emissziós hullámhosszon spektrofotométerrel detektáltuk.

III-IV. A H₂O₂ és a NAD(P)H mérése párhuzamosan

Az izolált mitokondriumok H₂O₂ képződését Amplex UltraRed fluoreszcens festékkel mértük. Az Amplex UltraRed (3 μ M) - H₂O₂ és tormaperoxidáz jelenlétében - átalakul fluoreszcens vegyületté, rezorufinná. A fluoreszcenciát spektrofotométerrel detektáltuk 37 °C-on 550 és 585 nm excitációs, ill. emissziós hullámhosszon. Minden mérést kalibráltunk 100 pmol H₂O₂-vel a kísérletek végén. Glutamáttal és maláttal (5-5 mM), ill. szukcináttal (5 mM) energetizált mitokondriumok H₂O₂ termelését határoztuk meg TEGDMA jelenlétében és hiányában.

Méréseinkben a H₂O₂ termeléssel egyidőben, ugyanabban a küvettában a NADH szintet is mértük, 340 és 466 nm-es gerjesztési és emissziós hullámhosszon a NAD(P)H autofluoreszcencia detektálásával.

A mitokondriális H₂O₂ eliminációja

A glutamát és maláttal energetizált mitokondriumokat (0,1 mg fehérje/ml) előinkubáltuk 5 percre TEGDMA (5 mM) vagy DMSO jelenlétében. 5 perc eltelte után H₂O₂-t (10 μ M)

adtunk a rendszerhez, majd 50 µl-es mintákat vettünk 30 másodperces időközökben 2 percig, és a maradék H₂O₂-t detektáltuk Amplex UltraRed fluoreszcens módszerrel.

A redukált glutation fogyasztás mérése

A redukált glutation (GSH) mérése a GSH szabad SH-csoportjának és a 5,5 ditio-bisz (2-nitro-benzoészav) (DTNB) közötti reakción alapul. A mérések előtt frissen készített (2mM) GSH inkubáltunk TEGDMA (5 mM) vagy DMSO jelenlétében 15 percig 37 °C-on. Az inkubációs elegyből mintát vettünk és a keletkezett TNB-t spektrofotométerrel mértük 412 nm hullámhosszon.

V. Az ATP szintézis mérése

Az izolált mitokondriumok ATP termelését egy kapcsolt enzimrendszer segítségével detektáltuk, amely hexokinázra és glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz enzimekre épült. A hexokináz enzim által katalizált reakcióban ATP jelenlétében a glükózból glükóz-6-foszfát képződött, majd a glükóz-6-foszfát tovább alakult 6-foszfoglukonáttá a glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz enzim hatására; miközben az NADP⁺ NADPH-vá redukálódik. A NADPH képződés arányos az ATP szintézissel, 1:1 sztöchiometriai arányban, kalibráció után. A mérés során a NADPH abszorbanciáját mértük spektrofotométerrel.

VI. A mitokondriális Komplex I aktivitás mérés

A CI aktivitásának mérése során a NADH NAD⁺ átalakulását lehet detektálni, miközben az elektron-akceptor a koenzim Q1. Az abszorbancia-változás kezdeti sebességét 340 nm-en detektáltuk spektrofotométer segítségével.

VII. Statikai analízis

Az adatok kiértékelése SigmaPlot programmal történt. Az egyszerű összehasonlításokat Student-féle t-próbával értékeltük. A többszörös összehasonlítások esetén az egyszempontos ANOVA variancia analízist alkalmaztuk. Azoknál az adatoknál, amelyek nem követtek normális eloszlást, ott Kruskal Wallis teszt segítségével értékeltünk. A p < 0,05 értékeket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

EREDMÉNYEK

I. A TEGDMA hatása a mitokondriális lézésre

A mitokondriális lézés érzékeny indikátora a mitokondriális funkcióknak. Az izolált mitokondriumokat α -KG, GM vagy Succ lézési szubsztrátokkal energetizáltuk. Az α -KG vagy a GM a mitokondriumba belépve a citrátkörben metabolizálódnak, amely folyamat során NADH keletkezik, ami a CI-en oxidálódik. Az izolált mitokondrium NADH+H⁺-t generáló szubsztrátjai a glutamát, a malát, az α -KG, míg a Succ oxidációja során termelődő FADH₂ oxidációja a CII-n történik. A lézési szubsztrátok jelenlétében alaplézést detektáltunk, majd az oxidatív foszforilációt ADP-vel (2 mM) indítottuk be. Ezt követően a mitokondriumokhoz TEGDMA-t adtunk. A kísérletek végén karboxi-atraktilátot (CAT) (2 μ M) adtunk a rendszerhez, amely gátolja az ADP-ATP cserét az ANT gátlásán keresztül.

➤ A CI-függő lézési szubsztrátok oxidációja

ADP jelenlétében a mitokondriális O₂ fogyasztás jelentősen nőtt mind az α -KG-tal és a GM-tal energetizált mitokondriumban. A magas respirációs kontroll-hányados (respiratory control ratio – RCR) (az ADP hozzáadás előtti és ADP hozzáadás után mért oxigénfogyasztás sebességének aránya) jó minőségű mitokondriális preparációra utalt a vizsgálatok során (RCR > 7). A TEGDMA (5 mM) hozzáadása 69%-kal csökkentette a mitokondriális oxigénfogyasztást α -KG jelenlétében. Az ANT gátlószer hozzáadásával csökkent a lézés az α -KG lézési szubsztrát esetén TEGDMA jelenlétében és hiányában. Hasonlóan az α -KG lézési szubsztrát esetén mért eredményekhez, a TEGDMA (5 mM) adása 88%-kal csökkentette az ADP-stimulált mitokondriális lézést GM lézési szubsztrát esetén. A TEGDMA szignifikáns hatása az ADP-stimulált mitokondriális O₂ fogyasztásra már 2 mM koncentrációnál jelentkezett GM jelenlétében. Ennél kisebb TEGDMA koncentrációk esetében (0,5; 1,0 mM) nem tapasztaltunk szignifikáns változást. A CAT csökkentette az oxigénfogyasztást mind a TEGDMA-val kezelt és nem kezelt mitokondriumban. A vizsgálataink során alkalmazott DMSO oldószernek nem volt toxikus hatása a mitokondriumokon. A pufferrel és a DMSO-val végzett kísérletekben azonos hatásokat detektáltunk a méréseink során.

➤ CII-függő lézési szubsztrát oxidációja

A lézési lánc más, nem NADH-hoz kötött bemenetét használó szubsztrát, a Succ oxidációját vizsgálva az ADP beadása után a TEGDMA nem befolyásolta szignifikánsan az

oxigénfogyasztást. Ezek az eredmények alátámasztják azt a feltételezést, hogy a TEGDMA nem gátolja a CII-t a légzési láncban. Jelen tanulmányban a CI-függő szubsztrátok jelenlétében megfigyelt csökkent mitokondriális légzés hátterében a következő okok állhatnak: (i) a csökkent ATP-áz aktivitás, (ii) az ANT gátlása, (iii) a légzési szubsztrátok és/vagy a szervetlen foszfátok csökkent transzportja, vagy (iv) a CI és / vagy az érintett dehidrogenáz enzimek hiányos működése. A Succ jelenlétében észlelt normális légzés azonban kizárta az i), ii) és részben az iii) pontokban felsorolt okokat. Az oxigénfogyasztás csökkenése mögötti mechanizmus tisztázása érdekében megvizsgáltuk a TEGDMA hatását a mitokondriumok membránpotenciáljára.

II. A TEGDMA hatása a mitokondriális membránpotenciálra ($\Delta\psi_m$)

A membránpotenciál a mitokondriumok bioenergetikai állapotának egyik fontos jellemzője, aminek a kiépülése alapvető feltétele az ATP szintézisnek. A $\Delta\psi_m$ -t α -KG, GM vagy Succ légzési szubsztrátokkal energetizált mitokondriumokon mértük. A légzési szubsztrátok jelenlétében a mitokondrium belső membránja hiperpolarizálódott, amit a safranin fluoreszcencia csökkenése jelzett. A GM esetén a $\Delta\psi_m$ magasabb volt, mint α -KG légzési szubsztrát hozzáadásakor, ami a GM gyorsabb oxidációját tükrözi. Az ADP további hozzáadásakor a membrán mindkét szubsztrát esetén depolarizálódott. Mind az α -KG és a GM légzési szubsztrátokkal energetizált mitokondriumok esetén a TEGDMA további depolarizációt okozott. CAT hozzáadásakor a TEGDMA-val kezelt mitokondriumok teljes depolarizációja következett be, ezzel ellentétben a kontroll mitokondriumokban a CAT a mitokondriális belső membrán hiperpolarizációját okozta. A mitokondrium teljes depolarizációja a szétkapcsolószer karbonilcianid-p-trifluorometoxi-fenilhidrazon hozzáadásával következett be.

Ellentétben a CI közreműködésével oxidálódó szubsztrátoknál (α -KG, GM) megfigyeltekkel, a szukcináttal energetizált mitokondriumban a TEGDMA hatására nem következett be depolarizáció. CAT hozzáadására hiperpolarizálódott a belső membrán a TEGDMA-val kezelt és a kontroll mitokondriumokban is. Jelenlegi vizsgálatainkban a $\Delta\psi_m$ mérések eredményei szintén alátámasztották, hogy a TEGDMA a CI-t gátolja. Ezek az eredmények ismételten azt bizonyítják, hogy a TEGDMA nem gátolja az ANT-t vagy az ATP-áz-t; ugyanis, ha ezeknek a molekuláknak a szelektív gátlószereit alkalmazzuk, akkor a $\Delta\psi_m$ hiperpolarizálna, függetlenül az alkalmazott légzési szubsztráttól. Az eddigi eredmények

összhangban vannak azzal a feltételezéssel, hogy a TEGDMA szelektíven gátolja a CI aktivitást.

III. A TEGDMA hatása a ROS homeosztázisra

Általános az egyetértés abban, hogy a TEGDMA a sejtekben oxidatív stresszt okoz, azonban pontos szerepe a redox egyensúly megbomlásában még nem tisztázott. Feltételezésünk szerint mitokondriális célpontok is részt vesznek a TEGDMA celluláris toxicitásában, amit az bizonyítana, hogy a TEGDMA fokozza a mitokondriális ROS termelést. Ezt a hipotézist vizsgáltuk a következőkben. Az alábbi kísérletekben a mitokondriális H_2O_2 termelést és eliminációt mértük GM CI-függő légzési szubsztrát jelenlétében, míg a CII-függő légzési szubsztrátok esetén (pl. Succ és α -GP) a H_2O_2 képződést detektáltuk.

➤ A mitokondrium H_2O_2 termelése NADH-termelő (CI-függő) légzési szubsztrátok esetén

A GM és az α -KG légzési szubsztrátok jelentősen fokozták a H_2O_2 termelést a mitokondriumokban. Az α -KG és a GM ADP hiányában különböző mértékben fokozta a H_2O_2 képződést. A légzési szubsztrát okozta fokozott arányú H_2O_2 termelés a GM esetén a gyorsabb oxidációnak és az ennek következtében kialakuló magasabb $\Delta\psi_m$ -nak köszönhető. Összefüggést találtunk a $\Delta\psi_m$ és a H_2O_2 termelődés között, ami egyezik Starkov és munkatársainak eredményeivel. Az ADP hozzáadása csökkentette a H_2O_2 termelést az α -KG- és a GM-t oxidáló mitokondriumokban. Minél magasabb volt a $\Delta\psi_m$ az ADP hozzáadása előtt, annál nagyobb volt a H_2O_2 termelés csökkenése. Az ADP után a TEGDMA adása szignifikánsan fokozta a H_2O_2 termelést mindkét légzési szubsztrát használatára. A CI gátlószerek alkalmazása esetén a H_2O_2 képződés fokozódását figyeltük meg vizsgálatainkban, amit több szerző is leírt már. A CI számos ROS képző hellyel rendelkezik; a légzési láncban azok az elektronszállító komplexek, amelyek az inhibitor kötőhelyétől proximálisan helyezkednek el nagymértékben redukált állapotban vannak, ami növeli az elektron „szökés” valószínűségét. A CI szubsztrátokat (glutamát plusz malát) oxidáló mitokondriumok esetében a TEGDMA jelenléte fokozta a H_2O_2 termelést mind ADP jelenlétében és hiányában. A fokozott H_2O_2 termelés így elfogyaszthatja az endogén antioxidánsokat, például a GSH-t és gátolhatja a glutationhoz kapcsolódó antioxidáns rendszereket.

A TEGDMA előkezelés hatása a ROS termelésre

A torna-peroxidáz (horseradish peroxidase - HRP) – Amplex UltraRed rendszer nem csak a H_2O_2 termelést detektálja, hanem eliminálja is a képződött H_2O_2 -t, mérsékelve a H_2O_2 termeléssel összefüggésben levő oxidatív stresszt. Ennek kiküszöbölése érdekében a mitokondriumot TEGDMA-val kezeltük elő 10 percig GM jelenlétében és Amplex + HRP hiányában. GM-tal energetizált mitokondriumokban Amplex UltraRed hiányában magasabb H_2O_2 képződést mértünk, mint Amplex UltraRed jelenlétében. Az előinkubált mitokondriumokban 5mM TEGDMA és ADP jelenlétében 95%-al magasabb H_2O_2 termelést detektáltunk, mint TEGDMA hiányában.

H_2O_2 eliminációja a mitokondriumban NADH-t termelő szubsztrátok esetében

Tekintettel arra, hogy a mitokondriumok fontos szerepet játszanak mind a ROS-képződésben és az eliminációban is, ezért vizsgáltuk meg a TEGDMA hatását az exogén H_2O_2 eliminációjára is. Az izolált mitokondriumok esetében exogén eredetű H_2O_2 hozzáadása mellett és TEGDMA (5 mM) jelenlétében illetve hiányában vizsgáltuk a H_2O_2 eltűnését. TEGDMA jelenlétében szignifikánsan csökkent a H_2O_2 elimináció GM légzési szubsztrát jelenlétében. Az eredményeink azt mutatják, hogy TEGDMA jelenlétében az elimináció valóban lassabb, ezért ezek az eredmények tovább erősítik az előinkubációs kísérletből levont hipotézist, hogy a TEGDMA károsíthatja az antioxidáns rendszert. Ez a jelenség a CI gátlásának is tulajdonítható, ami a mitokondriális $\Delta\psi_m$ csökkenését eredményezi. A CI gátlás miatt a NADH felhalmozódik, növekszik a NADH/NAD⁺ arány, ami a citrátkör NADH-függő dehidrogenázait gátolja, így maga után vonva a citrátkör lassulását. A membránpotenciál az energiafüggő transzhydrogenáz enzimek hajtóereje, amelyek elektronokat képes transzportálni az NADH-től NADP⁺ -re, így fenntartva a GSH regenerációjához szükséges NADPH szintet. Ha a $\Delta\psi_m$ csökken, akkor a GSH regenerációhoz nem lesz elegendő NADPH.

A TEGDMA és a GSH közötti kölcsönhatás

Az még mindig nem világos, hogy a TEGDMA közvetlenül vagy közvetetten befolyásolja-e az antioxidáns rendszert. Vizsgálatainkban újra értékeltük ezt a kérdést, ahol 2 mM GSH-t 5 mM TEGDMA-val inkubáltuk 15 percig mitokondrium mentes mérőoldatban. Szignifikáns, ám kismértékű változást találtunk 15 perccel az inkubáció után; a GSH koncentráció 3.7%-al csökkent. A TEGDMA glutation szintre való hatásának kétféle potenciális módja képzelhető el:

- a). a GSH direkt oxidációja TEGDMA által,
- b). a TEGDMA és a GSH direkt kémiai koordinációja.

A TEGDMA kémiai szerkezete nem indokolja a fokozott GSH oxidációt. Ezzel ellentétben a TEGDMA és a GSH kémiai koordinációja a TEGDMA és a GSH kémiai szerkezetei alapján nem zárható ki. Ez a koordináció potenciálisan csökkentheti az elérhető GSH koncentrációt. Ehhez a csökkenéshez nem szükségszerű, hogy a GSH-ban levő SH-csoport feltétlenül direkt kapcsolatban legyen a TEGDMA bármelyik atomjával, mert akkor az adduktban nem lesz elérhető a tiol csoport. Ez hozzájárulhat véleményünk szerint kis mértékben a mitokondriumtól függetlenül az oxidatív stresszhez.

➤ **A mitokondrium H_2O_2 termelése $FADH_2$ -termelő (CII-függő) légzési szubsztrátok esetén**

A légzési lánc $FADH_2$ -hoz kötött bemenetét használó szubsztrátokról is a legtöbb elektron a végső elektron akceptorra, az O_2 -re kerül a Komplex III- és IV-en keresztül. Ilyenkor az elektronok nagy része a szukcinát dehidrogenázról (SDH) előre (forward irányba; forward electron transport – FET) megy az O_2 felé és a *pmf* képzéséhez járul hozzá. Kísérletesen bizonyított, hogy ADP hiányában, Succ oxidációjakor magas membránpotenciál keletkezik, amely lehetővé teszi az elektronok egy részének áramlását a koenzim Q-ról a CI-re, a normál iránytól eltérően. Ezt a jelenséget reverz elektrontranszportnak (reverse electron transport - RET) nevezzük, amely a $NAD^+ \rightarrow NADH+H^+$ -vá történő redukcióját eredményezi a CI-en. A folyamat során ADP hiányában jelentős mennyiségű ROS termelődik, miközben a mitokondrium Succ-ot, vagy α -GP-ot oxidál. A mi kísérleteinkben a RET-et eszköznek használtuk fel azon bizonyítékok sorában, amelyekkel a TEGDMA CI-re való hatását kívántuk igazolni. Ilyen körülmények között a mitokondriális membránpotencial elég magas ahhoz, ahogy az elektronok a CII-ről a CI felé áramoljanak, ami a ROS termelés nagymértékű fokozódásban nyilvánul meg. A CI-függő légzési szubsztrátok esetén nincs RET, ezért ott nagyságrendekkel alacsonyabb H_2O_2 termelést tapasztaltunk.

H_2O_2 termelés a szukcináttal energetizált mitokondriumokban

A Succ-tal energetizált mitokondriumokhoz TEGDMA-t vagy DMSO-t adtunk. Már 0,5 mM TEGDMA koncentrációnál szignifikáns H_2O_2 képződés csökkenés volt megfigyelhető. Az ADP hatására további H_2O_2 csökkenés volt detektálható TEGDMA (5 mM) jelenlétében és a DMSO-val kezelt mitokondriumokban is egyaránt. Az ANT gátlásával, CAT hatására a

ROS termelés újra fokozódott. A TEGDMA-val kezelt csoportban a H_2O_2 termelődés szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a kontroll csoportban, ami arra utal, hogy a TEGDMA gátolta a CI-t. Fontos megjegyezni, hogy CI gátlásakor (pl. rotenon) a magas NADH/NAD^+ arány esetén a citrátköri dehidrogenázok is részt vehetnek a ROS termelésben.

H_2O_2 termelés az α -GP-tal energetizált mitokondriumban

Az agyban az α -GPGH aktivitása nagyon magas. Ez az enzim (hasonlóan a szukcinát dehidrogenázhoz; SDH) egyrészt elektronokkal látja el a légzési láncot, ahol az elektronok az UQ-ra (koenzim Q) kerülnek, másrészt RET-et is generál. Az α -GP-tal energetizált mitokondriumban a TEGDMA 47%-os H_2O_2 termelés csökkenést eredményezett. ADP jelenlétében nem volt megfigyelhető különbség a DMSO-val vagy a TEGDMA-val kezelt csoportban, mivel az ADP stimuláció megszünteti a RET feltételeit. Kontroll körülmények között a CAT visszaállította a H_2O_2 termelést arra a szintre, ami az ADP beadása előtt volt detektálható, mivel a CAT hiperpolarizálta (repolarizálta) a mitokondriális $\Delta\psi_m$ -et, és ezért visszaállította a RET-t a DMSO-val kezelt kontrollcsoportban. A TEGDMA-val kezelt mitokondriumokban a CAT fokozta a H_2O_2 termelés, de ez a hatás sokkal kisebb volt, mint a kontroll csoportban. Ez a jelenség is a CI gátlásával magyarázható.

IV. A TEGDMA hatása a NAD(P)H szintre

Mind a CI-függő (az α -KG és a GM), mind a CII-függő szubsztrátok (Succ és α -GP) adása növelte a mitokondriális NAD(P)H steady state szintet. Az α -KG és GM citrátköri oxidálódása során keletkező NADH -t a CI oxidálja. ADP hiányában a NADH/NAD^+ arány magas, ADP jelenlétében azonban a NADH nagy része oxidálódik. Az energetizált mitokondriumokhoz adott ADP csökkentette a NADH autofluoreszcenciát az összes vizsgált légzési szubsztrát esetén, mivel (i.) az ADP serkenti a légzést, (ii) a gyorsabb elektron áramlás fokozza a NADH oxidációját, és (iii) az ADP hatására kialakuló membránpotenciál-csökkenés gátolja a RET-et. A TEGDMA hozzáadása növelte a NADH -szintet mind α -KG, mind GM légzési szubsztrátok esetén. CI-függő szubsztrátok jelenlétében a TEGDMA által gátolt CI-en keresztül az elektronok továbbáramlása csökken a légzési láncban; ennek következtében a NADH nem tud oxidálódni, így mennyisége megnövekszik. Ez a megfigyelés döntő fontosságú a hatásmechanizmus szempontjából, mivel ez azt jelenti, hogy a TEGDMA gátolja a CI-t, de nem befolyásolja a reakcióhoz kapcsolódó dehidrogenázok működését, mert ha ezt befolyásolná, akkor a NADH -szint TEGDMA hatására nem emelkedne.

CII szubsztrátokkal, magas mitokondriális membránpotenciál esetén a RET biztosított, ami a CI-en keresztül fokozott NADH képződéshez vezet. Succ illetve α -GP jelenlétében a TEGDMA hozzáadása megelőzte az ADP hozzáadását a mitokondriumokhoz, ugyanis arra voltunk kíváncsiak, hogy a TEGDMA hogyan befolyásolja a RET-t. Ha a TEGDMA-t ADP után adtuk volna, akkor nem tudtuk volna megfigyelni a TEGDMA RET-re kifejtett hatását, az ADP okozta depolarizáció miatt. A TEGDMA jelenlétében a Succ-tal energetizált mitokondriumokban az ADP nem csökkentette a NADP(H) szintet a kontrollhoz viszonyítva a CI gátlása miatt felhalmozódott NADH következtében. CAT jelenlétében nem volt különbség megfigyelhető a NAD(P)H autofluoreszcencia értékekben a kontroll és a TEGDMA-val kezelt mitokondriumokban.

V. A TEGDMA hatása az ATP szintézisre

A mitokondriumok aktuális bioenergetikai funkcióinak pontosabb jellemzése érdekében az oxigénfogyasztás és a $\Delta\psi_m$ mellett, az ATP termelést is megvizsgáltuk. ADP adása után, a légzési szubsztrátok hiányában, az adenilát-kinázhoz (AK) kapcsolódó ATP szintézist lehetett detektálni az AK gátlószerének, a 200 μ M P^1, P^5 -di(adenozin-5') pentafoszfát (AP5) jelenlétében, ami nem gátolta teljes mértékben az AK aktivitását.

Az oxidatív foszforilációt a légzési szubsztrátok hozzáadásával indítottuk ADP jelenlétében. A GM-tal energetizált TEGDMA-val kezelt mitokondriumban az ATP termelés 86%-kal csökkent a kontroll csoporthoz képest. Ebből az eredményből arra lehet következtetni, hogy a CI gátlást okozó TEGDMA depolarizálta a mitokondriális membránt, és a kisebb proton gradiens következtében csökkent az oxidatív foszforiláció. Ez a mechanizmus sejtes rendszerekben is csökkent ATP termeléshez, a sejtek bioenergetikai paramétereinek romlásához és végül nekrotikus sejthalálhoz vezethet. A Succ-tal lélegeztetett mitokondriumok esetén nem csökkent szignifikánsan az ATP termelés, ami összhangban van az eddigi eredményeinkkel; mivel a TEGDMA a CI-t gátolja, az SDH-ról a CII-re kerülő elektronok szabadon áramolhatnak a CIV felé és az elektrokémiai potenciál az ATP termelésre fordítható.

VI. A TEGDMA hatása a CI aktivitásra

Ahhoz, hogy megerősítsük hipotézisünket, mely szerint a TEGDMA a CI-t gátolja, közvetlenül a CI aktivitását mértük. A CI aktivitása jelentősen csökkent a 2 és az 5 mM TEGDMA koncentrációk esetén. A CI aktivitás közvetlen mérése azt mutatta, hogy a

TEGDMA valóban gátolhatja a CI-t. A TEGDMA azonnali hatása arra utal, hogy a CI valóban a rezin monomer elsődleges célpontja lehet.

KÖVETKEZTETÉSEK

Az amalgám kivezetése a környezetvédelem szempontjából kiemelten fontos, megvalósulását a 2017/852-es EU-direktíva szabályozza. Az ötvözet teljes kivezetése mellett további anyagtani fejlesztések szükségesek az amalgám alternatívák (üvegeionomer cementek és a rezin bázisú kompozitok) kapcsán az ideális tömőanyag kifejlesztésére. A kompozitok elégtelen polimerizációja és biodegradációja következtében legnagyobb arányban kioldódó rezin monomer, a TEGDMA citotoxikus, genotoxikus és oxidatív stressz okozta hatásainak háttérében álló molekuláris célpont megkeresése volt munkánk célkitűzése.

Jelen disszertációban a TEGDMA hatásait vizsgáltuk agyból izolált mitokondriumok alapvető bioenergetikai funkcióira és a ROS homeosztázisra, mivel a ROS képzésben és eliminálásban, az apoptózisban és a sejtek életképességének meghatározásában a mitokondriumok fontos szerepet játszanak.

Új eredményeink a következők:

- A TEGDMA rezin monomer CI-függő légzési szubsztrátok esetén gátolta az O_2 fogyasztást az izolált agyi mitokondriumokban, míg CII-függő szubsztrátok esetén ez nem volt megfigyelhető.
- A TEGDMA adása CI-függő szubsztrátok esetén a mitokondriális membrán depolarizációjához vezetett, aminek következtében az oxidatív foszforiláció során csökkent az ATP termelés.
- A CI-függő légzési szubsztrátokkal energetizált mitokondriumokban fokozódott a ROS termelés és korlátozódott a ROS elimináció TEGDMA kezelés hatására. A TEGDMA a mitokondriális bioenergetika befolyásolásán keresztül és nem közvetlen kémiai reakcióval csökkentette a glutation szintet.
- Vizsgálataink alátámasztották, hogy a TEGDMA molekuláris célpontja a CI a mitokondriális légzési láncban. A CI gátlása megmagyarázza a TEGDMA irodalomban leírt toxikus hatásait.

Tanulmányunk során kimutattuk, hogy a TEGDMA rezin monomer -egy nagyon aktív metakrilát molekula - citotoxikus hatásait a CI gátlása nagymértékben magyarázza. A CI gátlásának következményei az O_2 fogyasztás csökkenése, a H_2O_2 termelés fokozása, a mitokondriális H_2O_2 elimináció károsodása, aminek oxidatív stressz és apoptózis a

következménye. Az ATP termelés csökkenése magas TEGDMA koncentráció mellett nekrotikus sejthalált okozhat. Az irodalomban számos közlemény tárgyalja az antioxidánsok pozitív hatását, amely eliminálhatja a TEGDMA okozta káros hatásokat, és a TEGDMA monomert kiváltó új monomerek fejlesztéséről szóló kutatási eredmények is biztatóak. Véleményünk szerint a TEGDMA rezin monomer valószínű molekuláris célpontjának megtalálása további sikeres anyagfejlesztéshez járulhat hozzá a fogászatban.

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

α -GP: alfa-glicerofoszfát

α -KG: alfa-ketoglutarát

α -KGDH: alfa-ketoglutarát dehidrogenáz

AK: adenilát- kináz

ANT: adenin-nukleotid transzlokáz

AP5: P¹,P⁵-di(adenozin-5') - penta-foszfát

CI: mitokondriális komplex I, NADH-koenzim Q oxidoreduktáz

CII: mitokondriális komplex II, szukcinát dehidrogenáz

CIII: mitokondriális komplex III, koenzim Q-citokróm c reduktáz

CIV: mitokondriális komplex IV, citokróm c oxidáz

CAT: karboxiatraktilát

DMSO: dimetil-szulfoxid

Δ pH: a mitokondrium belső membránjának két oldala közötti pH gradiens

$\Delta\Psi_m$: membránpotenciál

FET: forward electron flow; előre irányuló elektronáram

FCCP: karbonilcanid-*p*-trifluorometoxi-fenilhidrazon

GM: glutamát és malát

GSH: glutation

H₂O₂: hidrogén peroxid

KoA: koenzim-A

pmf: protonmotoros erő

RET: reverse electron flow; reverz elektrontranszport

ROS: reaktív oxigénszármazék

Succ: szukcinát

SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

A disszertációhoz kapcsolódó publikációk:

- 1) Mikulás K., Hermann P, Gera I, Komlódi T, Horváth G, Ambrus A, Tretter L. (2018) Triethylene glycol dimethacrylate impairs bioenergetic functions and induces oxidative stress in mitochondria via inhibiting respiratory Complex I. Dent Mater, 34: e166-e181.
IF (2017): 4.039

- 2) Mikulás K., Linninger M, Takács E, Kispélyi B, Nagy K, Fejérdy P, Hermann P. (2018) Paradigmaváltás a fogmegtartó kezelésben: az amalgámkorszak vége. Orv Hetil, 42: 1700-1709.
IF (2016): 0.349

Egyéb publikációk

Mikulás K., Kivovics P, Nagy G, Marton K, Madlena M. (2008) Complex oral rehabilitation of a patient with Witkop's syndrome: an interdisciplinary approach. Oral Health and Dental Management in the Black Sea Countries Vol. VII, No.2.