

DIPLOMADOLGOZAT

MAJOR FANNI CSILLA
Takarmányozási és takarmánybiztonsági mérnök

Gödöllő
2023



Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem
Szent István Campus
Takarmányozási és takarmánybiztonsági mérnök Szak

AZ OXIDÁNS ÉS ANTIOXIDÁNS RENDSZEREK
VIZSGÁLATA GÉNKIÜTÖTT NYÚL MODELLBEN
KOLESZTERINTERHELÉST KÖVETŐEN

Belső konzulensek: dr. Erdélyi Márta, egyetemi docens

dr. Bodrogi Lilla, tudományos főmunkatárs

Pintér Tímea, tudományos segédmunkatárs

Készítette: **Major Fanni Csilla**

HLIH31

Nappali tagozat

Intézet/Tanszék: Élettani és Takarmányozástani
Intézet, Takarmánybiztonsági
Tanszék

Gödöllő
2023

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	
I. Bevezetés.....	2
II. Célkitűzések	4
III. Irodalmi áttekintés	5
3.1. A nyúl emésztésének élettana	5
3.1.1. Takarmányalkotók emésztése	5
3.2. Lipid anyagforgalom	7
3.2.1. Lipidek.....	7
3.2.2. Lipidek lebontása.....	7
3.2.3. Lipidek bioszintézise	8
3.3. A nyúl zsírellátása	9
3.3.1. A vérszérum koleszterin, LDL, HDL és triglicerid tartalma.....	10
3.4. Biotechnológiai modellek a koleszterin anyagcsere vizsgálatára	11
3.4.1. Nyúlmodellek	11
3.4.2. A nyúl, mint modellállat a szív és érrendszeri elváltozások vizsgálatára	13
3.5. Az antioxidáns rendszer szerepe és szabályozása	14
3.5.1. Lipidperoxidáció.....	15
3.6. Az antioxidáns rendszer génexpressziós szabályozása	17
3.6.1. A TLR4 által mediált oxidált-LDL-nek való kitettség hatása a gyulladásos citokinek termelődésére	17
3.7. NOX enzimek.....	18
3.7.1. NOX 4	18
3.7.2. NOX és a szív és érrendszeri megbetegedések	19
IV. Anyag és módszertan.....	21
4.1. A kísérleti állatok.....	21
4.1.1. Etikai nyilatkozat.....	21
4.1.2. Az állatok tartása.....	21
4.1.3. A kísérleti csoportok kialakítása és kezelés.....	21
4.1.4. Az etetett takarmány paraméterei	21
4.1.5. Mintavétel módszere	22
4.2. Biokémiai vizsgálatok.....	22

4.2.1.	A redukált glutation koncentráció meghatározása	22
4.2.2.	A glutation-peroxidáz aktivitás meghatározása	23
4.2.3.	A malondialdehid mennyiségének mérése.....	23
4.2.4.	Az összkoleszterin koncentráció meghatározása	23
4.2.5.	A HDL-szint meghatározása	23
4.2.6.	Az LDL-szint meghatározása	24
4.2.7.	A triglicerid koncentráció meghatározása	24
4.3.	Génexpressziós vizsgálatok.....	24
4.3.1.	RNS izolálás	24
4.3.2.	cDNS átírás reverz transzkripció által	25
4.3.3.	Primerek.....	26
4.3.4.	A qPCR módszere.....	27
4.4.	Statisztikai módszerek	27
V.	Eredmények	28
5.1.	Biokémiai paraméterek.....	28
5.2.	Génexpresszió vizsgálata.....	34
VI.	Diszkusszió, új tudományos eredmények.....	39
6.1.	A szérum zsír összetételének változásai.....	39
6.2.	Az oxidált LDL által indukált TLR4 által közvetített oxidatív változások	39
6.3.	Az antioxidáns rendszer aktiválódása	41
6.4.	További javaslatok	43
VII.	Köszönetnyilvánítás.....	44
VIII.	Mellékletek.....	45
IX.	Irodalomjegyzék.....	47

Rövidítések jegyzéke

CAT – Catalase, kataláz

GAPDH – Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, gliceraldehyd-3-foszfát-dehidrogenáz

GPx – Glutathione Peroxidase, glutation-peroxidáz (enzim)

GPX – Glutathione Peroxidase, glutation-peroxidáz (gén)

GSH – Reduced Glutathione, redukált glutation

HDL – High Density Lipoprotein, magas denzitású lipoprotein

IL-1 β – Interleukin-1 beta

KEAP1 – Kelch-like ECH-associated protein 1

KO – Knock Out, génkiütött

LDL – Low Density Lipoprotein, alacsony denzitású lipoprotein

MDA – Malondialdehyde, malondialdehyd

NFE2L2 – NFE2 Like BZIP Transcription Factor 2

NOX4 – NADPH Oxidase 4, nikotinamid adenin dinukleotid foszfát-oxidáz 4 (enzim)

NOX4 – NADPH Oxidase 4, nikotinamid adenin dinukleotid foszfát-oxidáz 4 (gén)

ROS – Reactive Oxygen Species, reaktív oxigéngyökök

SOD2 – Superoxide Dismutase 2, szuperoxid dizmutáz 2

TG – Triglyceride, triglicerid

TLR4 – Toll-like receptor 4

WT – Wild Type, vadtypus

I. Bevezetés

A reaktív oxigéngyökök (Reactive Oxygen Species: ROS) homeosztázisának szabályozásának és molekuláris hatásmechanizmusainak feltérképezése kiemelkedő kutatási területnek számít napjainkban. Amennyiben a ROS-képződéshez köthető egyensúly szabályozása megváltozik, abban az esetben a prooxidánsok túlsúlyba kerülhetnek (meghaladva az antioxidáns-védőrendszer kapacitását) és ez a folyamat oxidatív károsodást idézhet elő a szövetekben. Amennyiben ez az állapot krónikusan fennáll, abban az esetben különböző patológiás folyamatok indukálódnak, amely betegségek (szív és érrendszeri elváltozások, karcinogenezis, immunbetegségek, idegrendszeri kórképek) kialakulásához vezethet.

A *nikotinamid adenin dinukleotid foszfát-oxidáz 4*, azaz *NADPH-oxidáz 4 (NOX4)* gén expressziója során képződő enzimfehérje a fiziológiás ROS-képzés szabályozásának egyik kulcsfontosságú eleme mind az állat-, mind a növényvilágban egyaránt. Schürmann, 2015 alátámasztotta, hogy a NOX4 fehérje hiányának következtében fokozott plakk-képződés figyelhető meg a vaszkuláris rendszerben, magas koleszterin tartalmú táppal történő táplálást követően. A NOX4-ről úgy vélik, hogy az érlelmeszesedéssel összefüggésben ateroprotektív tulajdonságokkal rendelkezik. A szuperoxid helyett egy másik ROS-prekurzort, hidrogén-peroxidot szabadít fel a spontán szuperoxid-diszmutáció következtében. A hidrogén-peroxid nem lép kölcsönhatásba a nitrogénoxiddal, így a NOX4 nem fokozza a peroxinitrit keletkezését, amely az ér fal oxidatív károsodásának gyakori kiinduló vegyülete (Di Marco, 2016; Zhang, 2010).

Vizsgálatunk során arra kerestük a választ, hogy a NOX4 gén kiütése hogyan befolyásolja a szervezet oxidáns-antioxidáns státuszát, valamint a lipidperoxidációs folyamatokat nyúlmodellben. Az ateroszklerózist, valamint a folyamat során kialakuló járulékos zsírmáját aterogén hatású takarmány adagolásával indukáltuk. A háttérmechanizmus megértése céljából génexpressziós vizsgálatokat (kvantitatív RT-PCR) végeztünk, valamint mértük a gyökfogó kapacitást és lipid anyagcserét jellemző biokémiai paramétereket (GSH, GPx, MDA, HDL, LDL, koleszterin, triglicerid) a vérmintákon. Célul tűztük ki, hogy a génexpressziós mintázatok eltéréseit fehérjeszinten is validáljuk és ezzel a NOX4 enzim funkcióját az érlelmeszesedés patológiás folyamatában jobban megértsük.

Mivel a NADPH-oxidázok szerepe a szervezetben ROS termelése, ez utóbbiak pedig lipidperoxidációs láncreakciót indíthatnak el, ezért hipotézisünk szerint a gén működésének blokkolása jelentősen megváltoztathatja a szervezet antioxidáns védelmi rendszerének

állapotát. Ez hatással lehet olyan folyamatokra – például érlelmeszesedés – amelyekben, a szervezetben fiziológiásan képződő ROS-ok szignálként működnek.

Kísérletünk során a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem Genetika és Biotechnológiai Intézet Precíziós Nemesítés Csoportja által előállított *NOX4* génkiütött (Knock Out: KO), illetve vad típusú (Wild type: WT) nyulakkal koleszterin-kiegészítést tartalmazó takarmányt etettünk. Ennek tükrében vizsgáltuk, hogy milyen mértékben változnak az ismertetett élettani paraméterek. Mivel a házi nyúl zsírsanyagcseréje és az annak zavarai összefüggésbe hozható kórképek kialakulása bizonyítottan hasonlít az emberéhez, ezért gyakran használják modellállatként ezen a területen.

II. Célkitűzések

A kutatás során az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

- 1, Van-e statisztikailag igazolható különbség az *NOX4* génkiütött, a vad típusú, valamint a kontroll (aterogén kiegészítésben nem részesülő) csoportok között az élettani paraméterek tekintetében?
- 2, Van-e statisztikailag igazolható különbség a *NOX4* génkiütött és vad típusú csoportokban az antioxidáns-oxidáns rendszert szabályozó gének expressziója vonatkozásában?
- 3, Milyen változások figyelhetők meg az élettani paraméterekben és az antioxidáns-oxidáns védőrendszert szabályozó gének expressziójában 10 hetes koleszterinetetés hatására?
- 4, Megfelelőek-e a vizsgált paraméterek az oxidatív stressz kimutatására koleszterin-tartalmú takarmány etetését követően?
- 5, Amennyiben kimutatható a koleszterin tartalmú takarmányozás hatására oxidatív stressz az állatokban, akkor ennek háttérében milyen élettani és molekuláris biológiai folyamatok állhatnak?

III. Irodalmi áttekintés

3.1. A nyúl emésztésének élettana

A tápcsatornán végig haladva a takarmányok táplálóanyagaikra bomlanak, és létfenntartó szerepet töltenek be. Többször energia bevitel során bőr alatti, valamint zsigeri zsír formájában raktározódnak, valamint termelésre fordítódnak haszonállatok esetében (Holdas, 1975).

3.1.1. Takarmányalkotók emésztése

A táplálóanyagok az emésztőtraktusban történő átalakulásuk alapján két csoportra oszthatók. Az emészthető frakció az, amelyet a szervezet által termelt enzimek képesek bontani, ilyenek például a fehérjék, a zsírok, a keményítő, a laktóz és a szacharóz (Csapó, 2018). A folyamat során a kiindulási vegyülethez kémiaiailag hasonló végtermékek keletkeznek, melyek a vékonybélből felszívódnak. A táplálóanyagok másik csoportjának emésztéséhez az állati szervezet nem rendelkezik saját enzimekkel. Ilyenek például a cellulóz, az arabinoxilánok és a β -glükánok. Ezt a frakciót a vastagbélben élő baktériumok fermentálják (Fonyó, 2011). A folyamat során a kiindulási vegyülettől kémiaiailag eltérő végtermékek keletkeznek.

A *fehérjék* bontása a gyomorban kezdődik pepszines hidrolízissel, mely során polipeptidok keletkeznek. A pepszin működési pH optimuma 1,0-2,5, melyet a sósav biztosít. A gyomornedv elválasztásának szabályozása humorális, azaz neurális és hormonális szabályozás együttes hatása alatt áll. A beérkező takarmány mechanikai hatást fejt ki a gyomor falára (neurális hatás), amely serkenti a gasztrin elválasztást. Ennek következtében a gyomornedv szekréció fokozódik. Ezt követően a takarmány tovább halad a vékonybélbe, s arra fejt ki mechanikai hatást, a vékonybél proximális szakaszában csökken a pH érték, az enterogasztron elválasztás fokozódik és a gasztrin elválasztás gátlásra kerül. Ennek következtében csökken a gyomornedv elválasztása. A polipeptideket ezt követően hasnyálmirigy eredetű enzimek bontják tovább, tripszin, kimotripszin és elasztán hatására további polipeptidok és oligopeptidok keletkeznek. A pancreasnedv szekréció szintén humorális szabályozású. A csökkenő pH érték a vékonybél proximális szakaszán és az így növekedő enterogasztrin szint serkeni a szekretin elválasztást, így a pancreasnedv szekréció fokozódik. A pH optimum ebben az esetben 7,6-8,2. Ezt követően a vékonybél eredetű enzimek hatására, karboxipeptidázok és aminopeptidázok, aminosavak és kis tagszámú peptidok keletkeznek. Ezek már fel tudnak szívódní a vékonybél egyrétegű hengerhámján keresztül. A pH optimum 6,5-7,5. (Fonyó, 2011).

A **zsírok** emésztését a hasnyálmirigy eredetű lipáz végzi. Ennek pH optimuma 7,6-8,2 között van. Epesavas sók - kolsav, kenodezoxikolsav-segítségével a zsírokat monogliceridekre, zsírsavakra, valamint glicerinre bontja. Ezt követően a vékonybélből történik a felszívás.

A fő zsír-emésztőenzim, a pancreas lipáz már születéskor termelődik a kisnyúlban. Az epesavas sók is már a 22 napos embrióban kimutathatók. Azonban a fehérjebontó enzim aktivitásával összevetve a zsírbontás szerénynek tűnik, mivel a tejzsír döntő hányada hidrolizálatlanul felszívódik a finom emulgeálásnak köszönhetően (Vetési, 1990).

A különböző **szénhidrátok** emésztésében alapvető különbségek vannak. Differencia fedezhető fel a keményítő, illetve a szacharóz és laktóz lebontása között. A keményítő feltárása a nyálban található enzimek segítségével kezdődik meg. Ennek pH optimuma 6-7,2 közé esik. Hatásukra dextrinek keletkeznek. A feltárás következő lépéseként a hasnyálmirigy-eredetű alfa-amiláz (pH optimum 7,6-8,2) hatására oligoszacharidok, dextrinek, maltóz és maltotrióz keletkezik. Utolsó lépésként glükóz és galaktóz keletkezik glukoamiláz és diszacharidáz hatására és felszívódik a vékonybélből. A pH optimum ez esetben 6,5-7,5. A szacharóz és laktóz lebomlása egy lépésben történik glükoamiláz és diszacharidáz hatására miután az felszívódik a vékonybélből (Vetési, 1990).

3.2. Lipid anyagforgalom

3.2.1. Lipidek

A lipidek közös jellemzője, hogy apoláros oldószerben oldódnak, míg poláros oldószerben nem (Gurr, 2011). Legfőbb alkotóelemeik a szén és hidrogén. Oxidációjuk során 38 kJ/g energiamennyiség szabadul fel, amely több mint kétszeresét jelenti a glikogén raktárokból felszabaduló energiának. Döntő többségük energiatároló szerepet tölt be. A neutrális zsírok kiemelkedők ilyen tekintetben. (Csapó, 2018). Emellett jelentős szerepet töltenek be a sejtek, valamint organellek kettős membránjának felépítésében. Továbbá szabályozó szerepet töltenek be hormonok, valamint vitaminok alkotóelemeiként is.

3.2.2. Lipidek lebontása

A lipolízis során glicerín, valamint szabad zsírsav képződik a trigliceridekből a lipáz enzim hatására. Ezt követően a glicerínből glicerín-3-foszfát keletkezik a májban, amelyből újra triglicerid képződik, vagy pedig belép a glikolízisbe dihidroxi-acetát-foszfáton keresztül. A trigliceridek és a koleszterin hidrofóbok, így nem fordulhatnak elő szabad formában, a plazmában. Foszfolipidekből és fehérjékből álló burokokban szállítódnak, amelyeket lipoproteineknek nevezünk. Alapvetően négy csoportját különböztetjük meg: HDL, LDL, VLDL és kilomikron. A plazmában lévő koleszterin egy részét HDL szállítja a májba, ahol epesav keletkezik belőle és elhagyja a szervezetet, vagy pedig beépül VLDL-be. A keletkező zsírsavak vérkeringésbe kerülnek, majd eljutnak az egyes szervekhez, főképpen a májhoz. A zsírsavak albuminhoz kötődnek, s így szállítódnak. Lebontásuk során a béta-oxidáció eredményeként acetyl-CoA képződik a mitokondriumban. A béta-oxidáció minden lépésében két-két szénatommal rövidül a zsírsav, miközben egy acetyl-CoA és egy NADH és FADH₂ képződik (William, 2013).

A legnagyobb jelentőségű takarmány eredetű szteránváz vegyület, amelyet ismerünk a koleszterin. A szájon át felvételre került koleszterin mintegy 90%-a átalakul epesavvá, melynek nagy része széklettel ürül koprosztanol formájában. A redukálást ebben az esetben a bélrendszerben megtalálható baktériumok végzik. A koleszterin a bőrben kalciferollá alakul enzimatis, valamint fotokémiai reakciók révén. Ezt követően először prekuzorrá alakítják a belső elválasztású szervek, majd pregnenolonná. A pregnenolon átalakul progeszteronná, amely már önmagában is hormon hatást fejt ki. Emellett viszont prekuzora mellékvesehormonoknak, például az ösztrogén, illetve egyes androgén hormonoknak (Csapó, 2018).

3.2.3. Lipidek bioszintézise

A **telített zsírsavak** szintézise acetil-CoA-ból indul ki. A szintézis palmitinsavig a citoszolban történik. A további lánchosszabbítás a mitokondriumban és endoplazmatikus retikulumban történik. A zsírsavak szintézisét egy multienzim komplex végzi, ebben többféle enzimfehérje, több fajta aktív centrummal vesz részt (Engelking, 2010). A szintézis megindulásához szükséges még annyi malonil-CoA, amennyi C2-es egység beépítése történik. Például a palmitát szintéziséhez szükséges hét darab malonil-CoA. A szintézis megkezdésekor Ac-CoA és malonil-CoA az acetil-transzferázhoz és malonil-transzferázhoz kapcsolódik. A malonil csoportot a transzacyláz átviszi az ACP-re. Az acilcsoport viszont a láncon belüli béta-keto-acil szintetáz cisztein oldalláncához hozzákapcsolódik. Energiaigényes folyamat a két acilcsoport kondenzációja. Ezt az energiát a malonil- és acilcsoport egyesülésekor kilépő széndioxid biztosítja, így tehát a folyamat irreverzibilis és termékként acetoacetyl-S-ACP keletkezik. A folyamat következő lépéseként a béta-keto-acil-ACP reduktáz hatására keto-acil-származék keletkezik és béta-hidroxi-butiril-származékká alakul. A hidrogén donor a szintézis redukciós reakciójában a $\text{NADPH} + \text{H}^+$. A redukciós lépést ezután vízkilépés követi, ennek katalizálását az enoil-ACP hidratáz enzim végzi. Az enoil-ACP reduktáz végzi a telítetlen kettőskötések redukcióját újabb $\text{NADPH} + \text{H}^+$ felhasználásával, végeredményül pedig butiril-A-ACP keletkezik. Ezzel befejeződik egy C2-beépülési ciklus (Csap, 2018).

Többszörösen telítetlen zsírsavak (arachidonsav, linolsav, linolénsav) képzésére az emlősök nem képesek, táplálék útján szükséges bevinniük. Ezeket tehát esszenciális zsírsavaknak nevezzük.

A **telítetlen kötést tartalmazó zsírsavak** keletkezését a monooxigenáz végzi úgy, hogy a molekuláris oxigén két elektronpárral reagál. Ezek közül az egyik a $\text{NADPH} + \text{H}^+$ -ról, a másik pedig a zsírsavról származik.

3.3. A nyúl zsírellátása

A korábban említett információra szeretnék visszautalni, miszerint a lipidek alapvetően energiatároló szerepet töltenek be az állati szervezetekben. A növényi eredetű lipideket olajoknak nevezzük. Ezek általában könnyebben emészthetőnek, illetve nagyobb energiaértékkel rendelkeznek, mint az állati eredetűek a nyúl emésztőrendszere számára, illetve javítják az ízletességet számára. A precíziós takarmányadag beállítása során számos szempontot ellenőriznünk. Az élettani paraméterek optimális kielégítése mellett figyelembe kell venni a gazdasági értéket is. Szükséges kiemelni, hogy a nyúl esetében fontos szempont a pellet minősége, amennyiben el szeretnénk érni a genetikai teljesítőképessége csúcsát termelés szempontjából (Peter, 1987). Full fat szójával, illetve más olajos magvakkal sikeresen lehet növelni a takarmány zsírtartalmát (Paul, 1985). Azonban gyapotmag kiegészítés hatására emelkedett vérkoleszterinszintet és érlemeszesedést figyeltek meg a nyulaknál (Ferguson, 1975).

A nyúlnak specifikus zsírszükséglete tulajdonképpen nincs, elegendő a takarmánnyal bevitt mennyiség, kiegészítésre nincsen szükség. A kiegészítéshez kapcsolódó vizsgálatok néhol ellentmondásosak. Egyesek szerint a zsírkiegészítés javítja a takarmányértékesítést és a testtömeg-gyarapodást, azonban egyes vizsgálatokban az ellenkezőjét észlelték. Czibulyás, 1985 leírása szerint a 2-5% zsírt tartalmazó takarmány a megfelelő a házinyúl számára. Gippert, 1979 szerint a takarmány kiegészítése 5% összezsír tartalomig állati eredetű zsírokkal a hízó nyulak takarmányértékesítését pozitív irányba befolyásolta. A zsírkiegészítés hatással van más takarmányalkotók emészthetőségére is, azonban az 5% feletti zsírkiegészítés az energia, fehérje és nyersrost kihasználását nem javítja. Kísérletek eredményei ugyanis arra utalnak, hogy nagy energiatartalmú tápok esetén a zsírkiegészítés rontja a táplálóanyag kihasználását és akár hasmenést is okozhat. Ellenkező esetben, a kis energiatartalmú tápok esetén javítja azt (Czibulyás, 1985).

Az állat testének zsírtartalma függ a takarmány energia-tartalmától. Nagy energiatartalmú takarmányozás esetén a zsírdepók képzésének aránya nagyobb, mint a kis energiatartalmú takarmány etetésekor. Ennek oka, hogy a bevitt kalória meghaladja a metabolikus folyamatok energiaszükségletét. A nyúl testének zsírösszetétele is függ a takarmánytól (Moore, 1968). A kutatókat komolyan foglalkoztatta a nyúlhús koleszterin tartalma, melyről sokáig azt állították, hogy alacsonyabb, mint más húsoké. Ennek tudatában funkcionális élelmiszerként is megállja a helyét napjaink modern táplálkozástani

felfogásában. Azonban későbbi vizsgálatok szerint ez az érték nem tér el szignifikánsan más húsoktól (Peter, 1987).

Linolsavra, linolénsavra és arachidonsavra gyakran hivatkoznak esszenciális zsírsavként, mivel az állat nem tudja ezeket hatékonyan szintetizálni. Amennyiben az említettek hiányoznak a takarmányadagból, abban az esetben hiánytünetek, bőr-, illetve növekedési problémák jelentkezhetnek. Ezek az esszenciális zsírsavak a sejtmembrán szignifikáns alkotórészei, illetve a számos biológiai funkcióval rendelkező prostaglandin prekursorai. Emellett a zsírban oldódó vitaminok miatt is fontos szerepük van, hiszen ezek elengedhetetlenek a megfelelő transzportjához, majd felszívódásához. Az említett esszenciális zsírsavak az esetek többségében megtalálhatók növényi olajokban, így az olajos magvak és egyes gabonamagvak a legjobb forrásai. A nyulak esszenciális olajsav hiánya a lágybélből származó bakteriális eredetű zsírsavak miatt ritka, azonban elsődleges zsírsavként a linolénsavat értékelik (Czibulyás, 1985).

Kihasználási kísérletek alapján a zsírok látszólagos emészthetősége a nyúlban kiemelkedő, 90-95%. Valójában ezen érték terhelve van egyfajta hibával, hiszen a bélrendszerben lévő szaponifikált zsírok nem határozhatók meg külön mérési módszerrel, így a kihasználási százalék közismerten eltér a valóságtól (Czibulyás, 1985).

3.3.1. A vérérum koleszterin, LDL, HDL és triglicerid tartalma

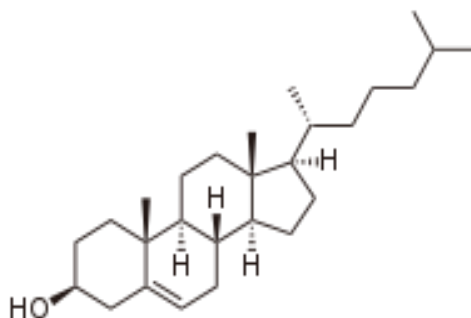
A vér összes koleszterinszintje (1. ábra) kiemelkedően fontos paraméter a szív és érrendszeri betegségek (HCD) patofiziológiájának vizsgálata során. Fontos értékmérő paraméter emellett az alacsony sűrűségű lipoprotein (low density lipoprotein, azaz LDL) és a nagy sűrűségű lipoprotein (high density lipoprotein, azaz HDL) összes mért mennyisége, illetve egymáshoz viszonyított aránya.

Az koleszterin az LDL-hez kapcsolódva szállítódik a keringési rendszerben a májból sejtes irányba. Az LDL a koleszterin diszlokációját követően újra a májba kerül, ismételt felhasználásra, vagy pedig bejut azokba a sejtekbe, melyeknek koleszterinre van szüksége. Speciális immunfolyamatok során a falósejtek közvetítésével beépülhet az érfalba, ami úgynevezett plakkok vagy lerakódások formájában jelenik meg. Ez később érlelmeszesedés kialakulásához vezet, ezért hétköznapi értelemben gyakran „rossz” koleszterinnek nevezik.

A HDL ezzel szemben kapcsolódik a többlet koleszterinnel a vérben, illetve a plakkokban is ugyan ez a mechanizmus megy végbe. Ezt követően visszaszállítja a májba a többlet koleszterint a májba, ahol lebomlik, illetve az epével kiválasztásra kerül, ezért ez az ún. „jó” vagy „védő” koleszterin. Közvetlenül részt vesz a vér koleszterinszintjének

csökkentésében, ezzel az érlemeszesedést akadályozza, érvédő hatással rendelkezik.

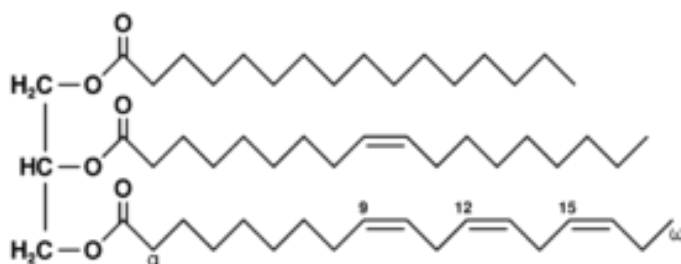
Trigliceridek (2. ábra) a vérzsírok egy másik csoportja, egy glicerinnmolekula és a hozzá kapcsolódó zsírsavakból épül föl. Élettani szempontból az energiaellátás során rendelkeznek jelentős funkcióval. A koleszterinnel együtt a megfelelőnek tekintett alapértéktől eltérő vérkoncentrációjának összefüggését a HCD-kel kimutatták.



1. ábra Koleszterin

(Forrás:

<https://hu.wikipedia.org/wiki/Koleszterin>)



2. ábra Triglicerid

(Forrás: <https://hu.wikipedia.org/wiki/Trigliceridek>)

3.4. Biotechnológiai modellek a koleszterin anyagcsere vizsgálatára

3.4.1. Nyúlmodellek

A NOX4-et elsőként a vese epitél sejtjeiben azonosították, ezt követően viszont számos különböző sejttypusban megtalálták, úgy, mint az endotél sejtekben, adipocitákban, neuronokban, a vaszkuláris simaizomzat, a fibroblasztok, a szívizomsejtek és a vázizomzat területén. A NOX4 a legszélesebb körben vizsgált NADPH-oxidáz és számos génmódosított rágcslómodellt hoztak létre a NOX4 funkció vizsgálatára.

Szemben a rágcslókkal a nyúl tekinthető a legfelelőbb alanynak a humán transzlációs kutatások számára. Ennek oka az ember és a nyúl közötti kisebb evolúciós távolság a többi

modellhez (patkányhoz, egérhez) képest, a genomszekvencia nagyobb fokú egyezése mellett élettani és patológias folyamatainak hasonlósága. Ez legszembetűnőbb a szív és érrendszeri betegségek vizsgálata során, illetve olyan esetben, amikor egyes gének hiányoznak a rágsálókban viszont mind az ember, mind pedig a nyúl hordozza a funkcióképes gént. Erre a NOX enzimesaládban is van precedens a *NOX5* gén esetében. Mindezek indokolták, hogy a nyúlra, mint modellállatra esett a választásunk vizsgálataink során. A jelen dolgozat tárgyát jelentő NOX4 mellett a NOX5 fehérje is szerepet játszik az érlemeszesedés kialakulásában, ezért ezek együttes, dupla génkiütött vonalon történő kutatását is tervezzük vizsgálni.

A NOX4 izoforma kutatását hátráltatja az endogén expressziós fehérjét megbízhatóan kimutatni képes specifikus antitest hiánya. A NOX4 intracelluláris lokalizációja nem tisztázott, a fehérjét számos intracelluláris helyen leírták, beleértve a sejtmagot, az endoplazmatikus retikulumot, a fokális adhézioakat, a plazmamembránt és a mitokondriumokat (Sirokmány, 2016).

Az endoteliális NOX4-ról feltételezik érvendő szerepét. Egy vizsgálatban felgyorsult érlemeszesedést fedeztek fel a *NOX4* génkiütött állatokban, amely a csökkent leukocita adhézioval magyarázható a NOX4 hiányos endotél sejtekben. A vizsgálat rámutatott a NOX4-ből származó ROS-ok feltételezett antiateroszklerotikus hatására is.

A NOX4 a szívben is jelen van, ahol pontos expressziós mintázata még meghatározásra vár (Zhang, 2010). Tanulmányozták a NOX4 szerepét a szív adaptációjában a nyomás túlterhelésre *NOX4* KO és olyan transzgenikus állatokkal, amelyekben szívspecifikusan túlexpresszálódik a *NOX4*. Eredményeik arra utalnak, hogy a *NOX4*-nek védő szerepe van a krónikus terhelés által kiváltott stresszben. Ez volt az első tanulmány, amely kimutatta, hogy az enzim hiánya káros is lehet.

Babelova és munkatársai 2012-ben három különböző kóroktanú krónikus vesebetegség lefolyását tanulmányozták *NOX4* génkiütött egérmodellben. A patológias állapot előidézésére a cukorbetegség által indukált vesekárosodást, az egyoldali húgy vezeték lekötést és az 5/6-nyi kiterjedésű nefrektómiát alkalmaztak. A *NOX4* hiánya egyik modellben sem volt protektív, és az egyoldali uréter lekötés által kiváltott fibrózis lefolyása még valamivel súlyosabb is volt a *NOX4*-hiányos állatokban. A vese proximális tubularis sejteiben tapasztalható nagy expressziós szint és a konstitutív ROS-termelő aktivitás az enzim még pontosan nem ismert fiziológiai funkciójára utalhatnak.

3.4.2. A nyúl, mint modellállat a szív és érrendszeri elváltozások vizsgálatára

Az **ateroszklerózis** a házinyúl bizonyos érvonalaiban spontán kialakul. Megfigyelték, hogy már fiatal, akár 6-8 hónapos korban az összes artéria falában, különös tekintettel az aortában rizsszemnyi elzsírosodott, elmeszesedett tartalmú aterómák és elmeszesedett kollagén és rugalmas rostos csomók tűnnek fel. Lipofág sejtek ugyancsak megjelennek, hasonlóan az emberben kimutatott megbetegedésekhez (Pachauri, 1976). A hajlam (koleszterin-anyagcsere zavara, hiperkoleszterinémia) állatcsaládon belül öröklődik. Az ilyen állatok szérumának értékei eltérnek a normál értékektől, az összlipid 20g/l és a koleszterin pedig 4,0 mmol/l értékeket mutat, tehát jelentősen emelkedett. Tulajdonképpen a lipoidok familiáris anyagcserezavaráról van szó (Vetési, 1990).

A **mészsólerakódások** az artériák falának tunica mediájában jelennek meg, melyek legkifejezettebben az aortafalban detektálhatók. Ez a folyamat házi nyúlban súlyos formában idült vese eredetű uraemia, illetve D-hipervitaminózis esetén jelentkezik. Ha az állat még E-vitaminban szegény is takarmányt kap, abban az esetben a betegség még súlyosabb formát ölt.

A **szívizomelfajulások** közül jellemző betegség a nyulakra az **izomrostok gócos zsíros beszűrődése**, amely apró zsírcseppes formában jelenik meg az izomrostokban. Általánosságban elmondható, hogy ez valamilyen toxikus ártalom vagy hipoxia következménye lehet. Házinyúlban leggyakrabban a nyári szállítások idején, vagy vemhességi toxikózis, illetve ellés után fordul elő (Vetési, 1990).

A fent említetteken kívül **hirtelen szívhalál** léphet fel súlyos idiopátiás cardiomegalia esetén is (Marie, 1971). Ekkor az izomrostok kontraktilis elemei széttöredeznek, vacuolumok jelennek meg, myolysis, interstitialis ödéma kialakulása és ezzel együtt a szív üregeinek jelentős kitágulása jön létre. Ennek egyik fő oka lehet az állatok hosszú ideig, szűk ketrecben való tartása, amely stresszt, és ezen keresztül szívelégtelenséget okoz.

A **szívurokgyulladás** savós, savós-fibrines, fibrines-gennyes jellegű lehet. Ezek be az esetekben a *Staphylococcus aureus*, a *Neisseria meningitidis*, és *Streptococcus pyogenes* a leggyakoribb kórokozók (Brook, 2009).

Kialakulhat **szívizomgyulladás** bakteriális sepsis, illetve súlyos gócos-elhalásos-gennyes alakban. Encephalitozoonosis esetén a szívben gócos limfocitás infiltráció alakul ki.

A **Zenker-féle szívizom elhalás** nyúl esetében elsősorban E-vitamin hiányakor jelentkezik, melyhez társulhat másodlagos izomrost-meszesedés is.

Nyúlfiókákban **areaktív szívizomrost-nekrózis** gócos formában is előfordulhat, mely *staphylococcus* okozta fertőzés esetén figyelhető meg. A szívizomrost elsődleges elmeszesedése D-hipervitaminóziskor figyelhető meg (Vetési, 1990).

A laboratóriumi állatmodellek fontos szerepet játszanak az emberi betegségek tanulmányozásában. A nyulak és az emberek lipidanyagcseréje, valamint az ateroszklerózis patogenezise nagy hasonlóságot mutat (Fan, 2015). A fejlett országokban az említett betegség a vezető halálozási okok közé tartozik, ezért számos transzgenikus nyúlmodellt hoztak létre, hogy tanulmányozhassák az élettani folyamatokat. Jelenleg háromféle általánosan elterjedt nyúlmodellt használnak: koleszterinnel táplált nyulakat, Watanabe hiperlipémiás nyulakat és genetikailag módosított (knock-out és transzgenikus) nyulakat (Fan, 2015). Bősze 2016-ban publikált cikkében valamennyi, a szív- és érrendszeri megbetegedések vizsgálatára kidolgozott nyúlmodellt összefoglalta (Bősze, 2016).

3.5. Az antioxidáns rendszer szerepe és szabályozása

Az oxidációs-redukciós egyensúly fenntartása, a pH szabályozáshoz hasonlóan központi szerepet játszik a homeosztázis fenntartásában. A redox folyamatok gyakorlatilag az összes alapvető élettani folyamatot átszövik, a bioenergetikától az anyagcseréig és az életfunkciókig (Sies, 2017).

A reaktív oxigéngyökök nagy reakcióképességű, rövid életű molekulák, amelyekben a pár nélküli elektron vagy elektronok az oxigénatom külső elektronpályáján helyezkednek el (Lengyel, 2010). Ezek igen reaktív részecskék és új elektronpár létrehozására törekednek. A reaktív oxigén származékok molekuláris oxigénből kialakuló molekulák. Ide sorolhatjuk tágabb értelemben az ózont (O^3), szuperoxidot (O^{2-}), a szinglet oxigént (O^-), illetve a hidrogén peroxidot (H_2O_2) is. Közülük szabadgyököknek csak a szuperoxid és a hidroxilgyök tekinthető.

Az oxigén más molekulákkal, mint például nitrogénnel is képezhet reaktív származékokat, például nitrogén-monoxidot (NO), amely szintén fontos signalling molekula (Zana, 2019). A ROS-képződés a szervezetben egy természetes folyamat, oxidatív eustresszre szükség van az életfolyamatok redox jelátvitel útján történő szabályozásához.

A vizsgálatok korábban azt támasztották alá, hogy a szabadgyökök csak fagociták által felszabadított melléktermékek a test védelme érdekében. Mára már világosan kimutatott, hogy jelátviteli szerepe van sok biológiai rendszerben, mind az növények, mind pedig az állatok sejteiben. A szabadgyökök nekrozist, programozott sejthalált indukálhatnak, aktiválják vagy blokkolják a sejtjelátviteli kaszkádokat és számos gén expresszióját

szabályozzák (Hancock, 2001).

A baktériumok és archaeák, csakúgy, mint az eukarióták antioxidáns védelmi útvonalakat fejlesztettek ki a ROS hatásának kompenzálására. Az antioxidáns védekezés fő védelmi vonalát elsősorban enzimek alkotják, de emellett megtalálhatók még kis molekulatömegű antioxidánsok is a szervezetben. Harmadik védelmi vonalként meg kell említeni azokat a komponenseket, melyek a már károsodott makromolekulák helyreállításáért vagy eltávolításáért felelősek.

Az antioxidáns enzimek termelődését egy jól jellemzett szignál kaszkád útvonal szabályozza. Oxidatív stressz következtében, a (Keap1) szenzor ciszteinjeit a ROS módosítja, ami az NFE Like BZIP Transcription Factor 2 (NFE2L2, korábban NRF2) stabilizációjához, felhalmozódásához és a sejtmagba történő transzlokációjához vezet. Az NFE2L2 a KEAP1-ről való disszociációt követően transzlokálódik a sejtmagba, ahol az NFE2L2 heterodimerizálódik (sMaf-fal), és az antioxidáns válaszelemhez (antioxidant response element, azaz ARE) kötődve aktiválja az antioxidáns gének transzkripcióját (Stefanson, 2014). Az NFE2L2 citoprotektív funkciója igazolt, amely az antioxidáns gének expressziójának szabályozásával kapcsolatos (Chen, 2022). A GWAS vizsgálatok alátámasztják, hogy az NFE2L2 több száz gén szabályozásában vesz részt (Raghunath, 2018). Ezek között szerepel a kataláz (CAT), továbbá a szuperoxid-dizmutáz (SOD), ami a hidrogénperoxidot eliminálja.

A glutation átalakulási folyamataiban résztvevő enzimek csoportja, köztük a glutation peroxidáz (GPX), ami a ROS mediált redukált glutation képződést katalizálja, melynek során a lipidperoxidokat alakítja át (Peluso, 2012). Emellett a glutation reduktáz (GSR), ami pedig a NADPH-függő oxidációt katalizálja, mely folyamatban a NOX4 által történő ROS képződésben részt vevő NADPH-nak is szerepe van (Handy, 2017; Zeeshan, 2016).

Az *NFE2L2* gén hiányában vagy az *NFE2L2* transzkripció faktor aktiválásának elmaradása következtében a kezdeti ROS-terhelés nem szűnik meg, ez mitokondriális károsodást és kiterjedt ROS-termelődést eredményez.

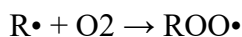
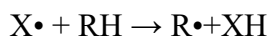
3.5.1. Lipidperoxidáció

Az ateroszklerózis oxidációs hipotézisének központi eleme az LDL oxidatív módosítása, emellett a lipidperoxidációs folyamatok indukciója. A szinglet oxigén és az ózon tudnak például ilyen folyamatot indukálni. Egyre több kutatás foglalkozik a lipid-peroxidációs termékek szerepével a sejtműködés szabályzásában, illetve jelátviteli hírvivőként betöltött

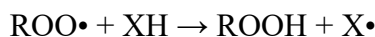
szerepükkel (Niki, 2005).

A lipidperoxidáció során a biológiailag aktív telítetlen kettőskötést (kettőskötéseket) tartalmazó zsírsavak reakcióba lépnek az oxigén eredetű molekulákkal, illetve szabad gyökökkel. Az oxidatív támadás célpontjai között szerepel a koleszterin és a telítetlen zsíracil-csoportokat tartalmazó foszfolipidek (Girotti, 1985). A folyamatok metastabil végtermékei között szerepelnek alkánok, aldehidek (alkenálok és alkanálok), mint például a malondialdehid (MDA). A MDA-koncentráció az oxidatív stressz és az antioxidáns státusz markere (Gaweł, 2004). A telítetlen zsírsavak peroxidációjával olyan vegyületek keletkeznek, amelyek károsítják a fehérjét és a sejtek genetikai állományát is.

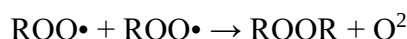
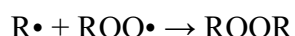
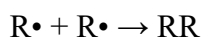
A lipidperoxidáció három részfolyamatra osztható (Mézes, 1986). Az *iniciáció* során a szabad gyök által hidrogén elvonással aktív állapotba kerül a lipid, eközben maga redukálódik. Ennek eredményeként keletkezett lipid, szabadgyök reakcióba tud lépni a molekuláris oxigénnel, melynek eredményeként lipidperoxid gyök keletkezik.



A *propagáció* során láncreakciószerűen terjed tovább a folyamat. A lipidperoxid gyökök hidrogént vesznek fel környezetüktől, azokat szabad gyökökké oxidálják, így ezek redukálódnak átmenetileg stabil lipidperoxidokká. A reakció további lépését a keletkezett szabadgyök biztosítja.



A *termináció* során szabadgyökök közötti reakciók során stabil gyökök és molekulák jönnek létre.



3.6. Az antioxidáns rendszer génexpressziós szabályozása

A **gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz GAPDH**, egy úgy nevezett housekeeping gén, ami azt jelenti, hogy az expressziója viszonylag stabil és folyamatos. Ezen géneket általában úgy írják le, mint "a sejtek létezéséhez nélkülözhetetleneket, függetlenül a szövetben vagy szervezetben betöltött specifikus funkciójuktól", és "stabilan kifejeződő géneket, függetlenül a szövettípustól, a fejlődési stádiumtól, a sejtciklus állapotától vagy a külső jelektől", ezért referenciagéneként alkalmazható génexpressziós vizsgálatokban. Egyes funkciói jól ismertek, ezek közül meg kell említeni az energia metabolizmust, ATP és piruvát termelésében betöltött szerepét az anaerob glikolízis révén (Nicholls, 2012). Bár a GAPDH fokozott génexpressziója és enzimatis funkciója a sejtproliferációval és tumorigenezissel hozható összefüggésbe, az olyan körülmények, mint az oxidatív stressz, károsítják a GAPDH katalitikus aktivitását, és sejtek öregedéséhez és apoptózishoz vezetnek. Jelen munkában referenciagéneként került kiválasztásra.

3.6.1. A TLR4 által mediált oxidált-LDL-nek való kitettség hatása a gyulladásos citokinek termelődésére

Az érlemeszedés kialakulása során gyulladásos folyamatok indulnak el, melynek progressziója során az immunrendszer is aktiválódik. A gyulladásos sejtek jelenléte az atheroszklerózis minden stádiumában megfigyelhető. Az aktivált gyulladásos sejtek szerepet játszanak az atheroszklerotikus plakkok kialakulásában és azok destabilizációját is előidézik. Ezen túl fontos szerepet játszanak a fertőző ágensek elleni védekezésben is.

Általánosságban elmondható, hogy az immunrendszer két, egymással szorosan összefüggő úton reagál hatékonyan a károsító ágensekre: a veleszületett és az adaptív immunfelismerő rendszerrel. Az adaptív immunrendszer a környezetben lévő kórokozókra jelen lévő egyedi antigén epitópokhoz való dinamikus alkalmazkodást foglalja magában (specifikus ellenanyagtermelés vezet). A veleszületett immunválasz az első védelmi vonal, és arra korlátozódik, hogy felismerje a magasan konzervált kórokozó motívumokat, a patogén-asszociált molekuláris mintákat (PAMP), melynek receptorai TLR-ek és a scavenger receptorok.

A TLR4 főként a Gram-negatív (G⁻) bakteriális lipopoliszacharid (LPS) receptora, mely kapcsolódás esetén a sejtben oxidatív burst-öt, illetve gyulladásos citokintermelődést indukál. A TLR-eket a veleszületett immunitásban betöltött döntő szerepük mellett az atheroszklerózissal is kapcsolatba hozták (Hongli Li, 2007). A TLR4 esetében az oxidált LDL

jelenti a trigger a TL-receptor 4 által mediált molekuláris útvonalak aktiválódásához, ami az antioxidáns rendszer aktiválódásához, a gyulladásos citokinek termelődésének fokozódásához vezet. Ez utóbbiak egyike az interleukin-1 β (IL1- β), melyet az aktiválódás folyamatának markermolekulájaként kívántunk vizsgálni jelen munkánk keretében is.

3.7. NOX enzimek

A NOX enzimek megtalálhatók szinte minden többsejtű élőlényben, jelen dolgozat azonban kifejezetten az emlősökben megtalálható enzimrendszerrel foglalkozik. A NADPH-oxidázok elektronok transzportját katalizálják a sejtmembránon keresztül, így szerepet játszanak a szervezet szabályozott ROS termelődésében. Az enzimcsalád tagjai olyan enzimkomplexek, melyek többkomponensűek, citoszolikus, valamint membránköthet aegységekből épülnek fel.

Első példa az emlős sejtekben a ROS termelésre a sejtek oxidatív robbanása volt. Ezért a fagocitákban kifejeződő NADPH-oxidáz a felelős. Oxidatív robbanásnak hívjuk azt a jelenséget, melynek során a fagocitáló fehérvérsejtek oxigén felhasználása jelentősen fokozódik. Kutatások során kiderült, hogy ez a többlet oxigén-fogyasztás szuperoxid termelésre fordítódik. Ez a mechanizmus kulcsfontosságú a kórokozók elpusztítása során. Az elmúlt évtizedben több fagocita-oxidázzal homológ enzimet is felfedeztek, melyek különféle szövetekben expresszálódnak. Ezeket ma a NOX enzim családként ismerjük, melynek hét izoformáját írták le emlősökben: a NOX1, NOX2, NOX3, NOX4 és NOX5 fehérjék, valamint a DUOX1 és a DUOX2 (Geiszt, 2011). A legfontosabb közös jellemzőjük egy konzervált, transzmembrán katalitikus doménon keresztüli elektrontranszfer, ahol elektron donorként NADPH-t, akceptorként pedig molekuláris oxigént használnak (Zana, 2019). A reakció során a szuperoxid anion vagy hidrogén-peroxid képződik.

A család tagjai között számos szerkezeti és működésbeli azonosság megfigyelhető. Közös tulajdonságaik között szerepel, hogy a membránon keresztül egy elektront transzportálnak, mely végül molekuláris oxigénre kerül, ezáltal O_2 – képződik. Illetve másik sajátosságuk, hogy a NADPH oxidázok aktiválódásához, szabályozásához elengedhetetlen különböző citoszolikus fehérjék jelenléte (Zana, 2019).

3.7.1. NOX 4

Jelen dolgozatban azzal foglalkozunk, hogy a NOX4 (NADPH-oxidáz4 szintéziséért felelős) gén kiütése hogyan befolyásolja a szervezet oxidáns-antioxidáns státuszát, és a fehérje hiányának milyen hatása van a lipidperoxidációs folyamatokra nagy koleszterintartalmú takarmány etetése esetén.

A NOX4 elnevezés mellett használják a vese oxidázt is, mivel az enzim jelentős

menyiségben, a vesében expresszálódik. A humán NOX4 egy olyan 578 aminosavból álló fehérje, mely jelentősen aktív, aminosav sorrendje 57%-os homológiát és 39%-os egyezést mutat a Nox2 enzimmel. Egymással 90%-ban homológ az egér és humán NOX4. Aktivitásához szükséges még p22phox és néhány endogénen expresszálódó sejtben Rac1 is. Geiszt és munkatársai humán vesében a vesepapillák epitéliumában, valamint a vesevelő gyűjtőcsatornájában detektálták. (Geiszt, 2000) A NADPH-oxidázok közül a NOX4 domináns az erek endoteljében, így az általa termelt O_2^- -nek komoly szerepe lehet a kardiovaszkuláris koordinációban, illetve az érlemezés kialakulásában (Donkó, 2010). Szubcellulárisan a NOX4-et kimutatták szinte az összes sejtalkotóban: nukleuszban, perinukleárisan, mitokondriumban, endoplazmatikus retikulumban és a plazmamembránban is.

A humán gén 160 kb-t ölel át a genomban és 18 exont tartalmaz. A 11q14.3-q21 kromoszómáriszen található a NOX4 génje. Ezen génről mRNS szintű vizsgálatok során azonosítottak további négy splice variánst (Goyal, 2005).

3.7.2. NOX és a szív és érrendszeri megbetegedések

Az **ateroszklerózis** olyan gyulladásos betegség, amelyben NADPH oxidázok aktiválódnak (Brandes, 2010). Számos tanulmány kimutatta, hogy a NADPH-oxidázok expresszálódásának fokozódása szerepet játszik a szív és érrendszeri betegségek kialakulásában. Ennek egyik oka, hogy működésük hozzájárul a lipidperoxidációhoz (Lassègue, 2012).

Egerekben kimutatták NOX2 típusú NADPH expresszálódását fagocitákban, valamint makrofágokban. Emellett az ateroszklerotikus plakkok vaszkuláris sejtjei is fokozott NADPH-oxidáz expressziót mutattak (Judkins, 2010). A plakkanyag NADPH-oxidázok aktív expressziójának ellenére rácsáló modellekben ateroszklerózisra irányuló vizsgálatok során eltérő eredmények születtek azzal kapcsolatban, hogy a NOX fehérjék mekkora mértékben járulnak hozzá a betegség kialakulásához. Az étrend által kiváltott érlemezés elleni védelem ApoE knockout egerekben és a NOX2 kiütése csak kis mértékben befolyásolta a fejlődést.

Ellentmondásos eredmények azért születtek, mivel a ROS pro-ateroszklerotikus hatására erős bizonyítékok állnak a rendelkezésre (Huige Li, 2009). Másrészt a ROS-eltávolítás szintén ellentmondó eredményeket hozott az érlemezés kialakulásában, és az antioxidánsok ateroszklerózis-ellenes hatása általában nem megfelelő, vagy akár hiányozhat is (Brandes, 2010). Ezek az adatok összességében arra utalnak, hogy a ROS szerepe az

érelmeszesedésben összetettebb, mint azt eredetileg feltételezték. Ennek ismeretében további vizsgálatok szükségesek a jelenleg ellentmondásosnak tűnő folyamatok tisztázása érdekében.

Amíg az érrelmeszesedésről eltérő bizonyítékok állnak a rendelkezésünkre, addig az érsérülések gyógyulása során képződő **neointima** fejlődésében a NADPH- oxidázokkal való összefüggését már bizonyították. Például az enzimeket blokkoló 91ds peptid gyengítette a neointima képződést patkány modellekben (Jacobson, 2003). *NOX1*-es kísérletek mellett más NADPH-oxidázok fokozott expresszáldását is megfigyelték érkárosodás után. Az érgyógyulás késői szakaszában jellemző a *NOX4* megjelenése.

A **vérnyomás központi idegrendszeri szabályozása** esetében tanulmányozták a NADPH-oxidázok szerepét, melyek eltérően expresszáldnak az idegrendszerben. A központi idegrendszer fontos szerepet játszik a vérnyomás szabályozásában, mivel szabályozza a vízháztartást és a szimpatikus aktivitást. A NADPH-oxidázok szerepét ebben a folyamatban az egyes *NOX* homológok downregulációjával tanulmányozták, azaz olyan adenovírus vektorokkal, amelyeket közvetlenül a nyúltvelőben juttattak be. A központilag alkalmazott angiotenzin II teljes vazopresszor hatásához mind a *NOX2*-re, mind a *NOX4*-re szükség volt (Cao, 2009).

A **magas vérnyomás-betegség** kialakulásában több tényező vehet részt. A megnövekedett perifériás ellenállás mellett a fokozott szív működés, a vese csökkent nátrium- és vízkiválasztása, valamint a vérnyomásszabályozás centrális zavara egyaránt hozzájárul a magas vérnyomás kialakulásához. Igaz, hogy ezek a tünetek együttesen jelentkeznek, az $O_2^{\cdot-}$ -ből származó NO_2 semlegesítés és az ebből származó perifériás ellenállás miatt régóta úgy gondolják, hogy a NADPH-oxidáz vezető szerepet játszik a magas vérnyomás patogenezisében. Számos tanulmány tesztelt különböző antioxidánsokat hipertóniás modellekben, de a NADPH-oxidáz-kiütött egereken végzett kísérletek száma még mindig korlátozott (Brandes, 2010).

A **pulmonális hipertónia** egy multifaktorilis betegség, amelyet megnövekedett pulmonális vaszkuláris rezisztencia jellemez. Etiológiai tényezői között szerepel a hipoxia, a gyulladás, a sejtproliferáció, valamint az apoptózis, melyek együttesen érszűkülethez vezethetnek. A NADPH-oxidázok szerepet játszanak ezen egyedi folyamatok patofiziológiájában, ezért valószínűnek tartjuk, hogy a *NOX*-eredetű ROS hozzájárul a pulmonális hipertónia kialakulásához. Hipoxiás egerekben kimutatták, hogy a *NOX4* expresszió fokozódik az érrendszerben és pulmonalis hypertonia alakul ki (Liu, 2006).

IV. Anyag és módszertan

4.1. A kísérleti állatok

4.1.1. Etikai nyilatkozat

Minden állat a kutatási célra használt állatok gondozásáról és felhasználásáról szóló magyar jogszabályokkal szigorú összhangban volt kezelve, a kísérletet jóváhagyta a MATE Állatjóléti és Etikai bizottsága, és Pest Megyei Kormányhivatal által a kísérlet a PE/EA/00741-7/2022 engedélyezési számon került regisztrálásra. Az állatok szenvedésének minimalizálásáért minden lehetséges erőfeszítést elkövettünk. A vad típusú és a *NOX4* génkiütött állatok a MATE-GBI állatházában fenntartott tenyészetből származtak.

4.1.2. Az állatok tartása

A kísérlethez használt nyulakat a MATE-GBI állatházában tartottuk. A kísérlet elvégzésének időszakán kívül az állatok egyedi ketrecekben voltak elhelyezték, a vízhez és takarmányhoz állandó hozzáférést biztosítva, standard megvilágítási programmal, (06.00–18.00 h) és 20 °C hőmérsékleten.

4.1.3. A kísérleti csoportok kialakítása és kezelés

A plakképződés indukálására 0,5% (m/m) koleszterint tartalmazó, nagy zsírtartalmú, aterogén takarmányt kaptak az állatok napi 120 g/nap mennyiségben. 20 hetes vad típusú és *NOX4* génkiütött (*NOX4-KO*) bak nyulakat (n=5) használtunk a kísérleti csoportok kialakításához (n=5). Egy aterogén kiegészítést nem tartalmazó takarmánnyal táplált, vad típusú, ún. kontroll csoportot is kialakítottunk (n=5). Négy napig 50% normál és 50% kiegészített koleszterin tartalmú takarmányt kaptak, majd 10 hétig kizárólag 120 g/nap 0,5% koleszterin kiegészített aterogén takarmányt fogyasztottak. A kísérlethez bakokat használtunk, mivel általában kisebb és stabilabb koleszterinszintjük van, mint a nőstényeknek. További vizsgálatok során érdekes lehet összehasonlítani a két nem eltéréseit. Egyetlen állatot sem zártunk ki a statisztikai értékelés során. A 10 hetes diéta alatt nem tapasztaltunk eltérést a csoportok között sem a takarmányfelvételben, sem pedig a súlygyarapodásban, a kezdeti carcass-tömeg nem tért el szignifikánsan.

4.1.4. Az etetett takarmány paraméterei

A kiegészített koleszterint tartalmazó, valamint a kontroll csoportnak adagolt takarmányok bemérése megtörtént az Állattenyésztési Teljesítményvizsgáló Kft. Takarmányvizsgálati

Laboratóriumában, illetve a munkatársak továbbították nedves kémiai mérésre ellenőrzés céljából a Mezőlabor Kft. számára (1., illetve 2. melléklet). A vizsgálatok során NIR, illetve Weende-i-analízis (nedves kémiai) módszereit alkalmazták.

Az eredményekből egyértelműen kitűnik, hogy nem látható szignifikáns eltérés a két mérési eredmény között, tehát a NIR mérési módszer pontos eredménnyel szolgál granulált nyúl takarmány esetén. Pontossága mellett másik előnye a gyorsaság, ugyanis ezekhez az eredményekhez 24 órán belül hozzáfértem.

Ki szükséges emelni emellett, hogy a kétféle takarmány egyes táplálóanyag paramétereiben sem található statisztikailag kimutatható eltérés. Azonban a vérparaméterekben mégis voltak kimutatható változások, amelyből új tudományos hipotézisek is születtek.

A vizsgálati jegyzőkönyvek a **mellékletek** fejezetben részletesen áttekinthetők.

4.1.5. Mintavétel módszere

Vérmintákat vettünk az aterogén diéta megkezdése előtt (0. időpont) és végén (10. hét), illetve az etetési időszak félidejében (5. héten). A mintákat centrifugálás és plazma, illetve vörösvértest hemolizátum frakciókra szétválasztva -20 C-on tároltuk felhasználásig.

A mintavételezés a fülartériából történt EDTA-s csövekbe. A biokémiai paraméterekhez mintánkként 3ml vér került levételre. A génexpressziós vizsgálatokhoz 3ml teljes vért vettünk Tempus Blood RNA Tube (Catalog nr.:4342792) csövekbe a gyártó utasításainak megfelelően, -20 C-on tároltuk további felhasználásig.

4.2. Biokémiai vizsgálatok

4.2.1. A redukált glutation koncentráció meghatározása

A GSH-koncentrációt szérumból mértük (Sedlak & Lindsay, 1968) módszerének megfelelően. A reakció alapját az képezi, hogy a glutation szabad SH-csoportja színes komplexet képez szulfhidrid-reaktív vegyületekkel. A mintákban található fehérjét 10% (w/v) triklórecetsav oldattal kicsaptuk, majd ezt követően a csapadékot centrifugálással (10.000 g, 3 min) gyűjtöttük össze az Eppendorf cső alján. A továbbiakban a felülúszóval dolgoztunk tovább. Az 5,5-ditiobis-(2-nitro-benzoészav) (Sigma, St. Louis) reagens színes (sárga) komplexet képez a felülúszóban lévő nem-fehérje szulfhidrid csoportokkal. A színintenzitás arányos a GSH koncentrációval, így fotometriásan mérhető. A komplexképződéshez szükséges lúgos közeg trisz-hidroximetil-aminometán (Sigma, St.Louis) puffer használatával került beállításra. A koncentrációt 412 nm-es hullámhosszon történő abszorbancia méréssel határoztuk meg.

4.2.2. A glutation-peroxidáz aktivitás meghatározása

A GPx-koncentrációt szérumból határoztuk meg. A módszer alapja, hogy a reaktív oxigéngyökök jelenlétében a redukált glutation az enzim közreműködésével glutation-diszulfiddá (GSSG) oxidálódik. A vizsgálati rendszerben a koszubtrátok GSH (Sigma, St. Louis) és kumol-hiperoxid (Merck, Darmstadt), egy szerves peroxid voltak. Az erzimreakció végbemenetléhez szükséges idő 10 perc, melyet 10%-os TCA végzett fehérjekicsapással állítottunk le (Carlo Erba, Rodano). A GSH-fogyását az 5,5-dithiobis-(2-nitro-benzoészav) -val (Sigma, St. Louis) képzett komplexének fényelnyelésével határoztuk meg 412 nm hullámhosszon spektrofotométerrel. Az enzimaktivitást a minták fehérjetartalmára vonatkoztatva adtuk meg és egységben fejeztük ki, amely 1 nmol redukált glutation oxidációját jelenti percenként a használt rendszerben, 25 °C-on (Matkovics, 1988).

4.2.3. A malondialdehid mennyiségének mérése

A malondialdehid olyan metastabil végtermék, mely a többszörösen telítetlen zsírsavak peroxidációja során keletkezik. A módszer alapját képezi, hogy az MDA 2-tiobarbitursavval (Sigma, St. Louis) savanyú közegben és magas hőmérsékleten sárgás-vörös színű komplexet képez. Ennek abszorpciós maximuma 535 nm-en mérhető spektrofotometriásan. A rendszer megfelelő pH-értékének beállítását 10%-os TCA-val végeztük (Carlo Erba, Rodano). A centrifugálást (10000g, 3 perc) követően, az abszorbancia mérése a felülúszóból reagens vakkal szemben 535 nm hullámhosszon történt. Standardként 1,1,3,3-tetra-etoxi-propán (Fluka, Buchs) került alkalmazásra (Placer és mtsai., 1966); Matkovics, 1988).

4.2.4. Az összkoleszterin koncentráció meghatározása

A Diagnosticum Zrt. által forgalmazott reagenskészlettel (No. 47061) határoztuk meg a szérum koleszterin koncentrációját. A mérés (Allain, 1974) által leírt módszer alapján 505 nm-en történt. A koleszterinészter-hidroláz hidrolizálja a koleszterin észtereket, az így létrejövő szabad koleszterin a koleszterin-oxidáz koleszteronná alakítja át. A mérés során hidrogén-peroxid keletkezik (H₂O₂). A hidrogén-peroxid, a fenol és a 4-aminoantipirin indikátorreakciója során peroxidáz enzim segítségével egy vörös kinon származék képződik. A megjelenő szín intenzitása 505 nm-en mérve arányos a koleszterin koncentrációval.

4.2.5. A HDL-szint meghatározása

A CliniChem Kft. által forgalmazott reagenskészlettel (No. 47661) határoztuk meg a szérum HDL-koncentrációját. A mérés alapját képezi, hogy az 1. reagensben lévő anti-humán béta-lipoprotein hozzákötődik a szérumban a HDL-en kívül megtalálható összes lipoproteinhez (LDL-hez, VLDL-hez és kilomikronokhoz). A 2. reagensben megtalálható koleszterin-

észteráz és koleszterin-oxidáz csak HDL-C-vel tud reagálni. Az enzimmal történt reakciók hatására a HDL-C-ből keletkezett hidrogén-peroxid peroxidáz jelenlétében egy oxidatív kondenzációs reakció eredményeként az N-etil-N-(2-hidroxi-3-szulfopropil) -3,5-dimetoxi-4fluoralaninnal és 4-amino-antipirinnel egy kék színű komplexet képez, amelynek abszorbanciája 593 nm-közeli hullámhosszon mérhető.

4.2.6. Az LDL-szint meghatározása

A CliniChem Kft. által forgalmazott reagenskészlettel (No. 47791) határoztuk meg a szérum LDL-koncentrációját. A módszer alapjául szolgál, hogy amennyiben a mintát az 1. reagenssel elegyítik, a benne lévő maszkírozó anyag az LDL-hez kötődik és megvédi az enzimreakciótól. A koleszterin-észteráz és a koleszterin-oxidáz reagál a nem-LDL-lipoproteinekkel. Az enzimreakciók révén a nem-LDL-koleszterinből képződő H₂O₂-t elbontja az 1. reagensben lévő kataláz. A 2. reagens hozzáadagolásával a maszkírozó anyag leválik az LDL-ről és a katalázt inaktíválja a nátriumazid. Ebben a második lépésben a CHE és a CO kizárólag csak LDL-C-vel reagálhat. Az enzimreakció során az LDL-C-ből keletkezett H₂O₂ hidrogén-peroxid peroxidáz jelenlétében oxidatív kondenzációt közvetít az N-(2-hidroxi-3-szulfopropil) -3,5-dimetoxianilin és a 4-aminoantipirin között és egy színes komplex keletkezik. A kék színű komplex abszorpciója 600 nm-körüli értéken mérhető és arányos az LDL koncentrációval.

4.2.7. A triglicerid koncentráció meghatározása

A Diagnosticum Zrt. által forgalmazott reagenskészlettel (No. 47163) határoztuk meg a szérum triglicerid koncentrációját. A meghatározás alapelve az, hogy a triglicerideket a lipoprotein-lipáz glicerinnre és zsírsavakra bontja (Bucolo, 1973), majd a glicerinn-kináz (GK) -adenozinn-trifoszfát (ATP) és Mg²⁺ ionok jelenlétében – foszforilálja azt, amelynek eredményeként glicerinn-3-foszfát képződik. Ez molekuláris oxigén jelenlétében a glicerinn-3-foszfát-oxidáz (GPO) révén oxidálódik. Fenol származék és 4-aminoantipirin indikátor reagáltatásával a reakció során felszabaduló H₂O₂ peroxidáz enzim jelenlétében színes terméket eredményez, amely 505 nm-en mérhető.

4.3. Génexpressziós vizsgálatok

4.3.1. RNS izolálás

Az RNS izolálást az Applied Biosystems™ Tempus™ Spin RNA Isolation Kit-tel végeztük, a gyártó utasításainak megfelelően, azt pontosan követve. A módszer lépései röviden összefoglalva. A Tempus csőbe levett mintákat PBS-sel 12 ml-re egészítettük ki, majd vortexszel alaposan összekevertük és centrifugáltuk (30 perc, 4°C-on 3000 g). A felülúszó

leöntését követően az RNS-t reszuszpendáltuk 400 µl “RNA purification resuspension solution” oldattal. RNáz mentes csőbe helyeztük az RNS megkötésére alkalmas oszlopokat, melynek membránját 100 µl “Wash solution 1” oldattal nedvesítettük. A 400 µl mintát az oszlopra pipettáztuk, majd centrifugáltuk (30 másodperc (mp)) 13.000 rpm, minden további centrifugálás ezen a fordulaton történik. Az átfolyt oldatot kiöntöttük, majd az oszlopot visszahelyeztük a csőbe. 500 µl “Wash solution 1” oldattal mostuk az oszlopot, centrifugáljuk (30 mp, maximum sebesség), majd az átfolyt oldatot leöntjük. 500 µl “Wash solution 2” oldatot pipettáztunk az oszlopra, majd centrifugáltuk (60 mp), az átfolyt oldatot leöntöttük. Ezt követően DNáz kezelés következik (Qiagen, RNase free DNase Set, ID:79254), 10 µl DN-áz és 70 µl RDD puffert mintánként össze kell mérni, majd felvisszük az oszlopra és 15 percig szobahőmérsékleten inkubáljuk. Ezt követően 500 µl Wash solution 2 oldattal kétszer mostuk az oszlopot, majd megszáritottuk a membránt centrifugálással (1 perc) és új csőbe helyeztük át, majd 80 µl Rnáz mentes vizet vittünk fel az oszlopra. Ezt követően inkubáljuk 2 percig 70°C-on, majd centrifugáltuk (30mp), majd a felülúszót visszapiptáztuk a membránra és újabb 30 másodpercig centrifugáljuk. Végül az RNS oldat koncentrációját megmértük NanoDrop készülékkel. A mintákat felhasználásig -70°C-on tároltuk.

4.3.2. cDNS átírás reverz transzkripció által

A tisztított teljes mRNS-t stabil szerkezetű komplementer cDNS-sé írjuk át. Ez a folyamat a reverz transzkripció. Az mRNS érési fázisa végén 3' végre kerülő poly-A farok egy két-háromszáz bázishosszúságú adenin telített szakasz, ehhez kapcsolódik a timinben gazdag primerünk (Oligo(dT)), így a reverz transzkriptáz enzim elvégzi az mRNS átírását komplementer szállá. Az átíráshoz az Applied Biosystems™ High-Capacity cDNA Reverse Transcription with RNase Inhibitor Kit-jét használtuk (Cat.4374966), végig jégen tárolva a mintákat és a mixeket. A reakcióban 400 ng RNS-t írtunk át 20µl végtérfogatban. A mintákat 25°C-on, 10 percig anelláltattuk, majd 37°C-on 120 percig inkubáltuk, végül 85°C-on 5 percig tartott az enzim inaktivációja. A további felhasználáshoz 10x-es hígítást végeztünk.

4.3.3. Primerek

Az online elérhető Primer3 software segítségével történt a primerek tervezése nyúl referencia szekvenciák alapján.

Primerek szekvenciája (1. táblázat):

Gén	Forward	Reverse
GAPDH	ATCTCGCTCCTGGAAGATGG	CAAAGTGGATGTTG TCGCCA
KEAP	G TTCCTCTCCGGGTAGTAGC	CCTCAACCGCCTGCTCTAT
NFE2L2	GCTCATCCCGTAACATGCTG	AAGTGGCTGCTCAGAATTGC
TGFβ	CTGATCAGGTGCAGGAGGAG	CTCCGACTTG TAGGCCTTCA
GPX	AGTTTGGGCATCAGGAGAACG	GAAGAGCATGAAGTTGGGCTC
CAT	ACTCGCGAACCGAAACTCTC	AGGACATCGGGTTTCTGCG
SOD2	CAC ATC AAC CAC ACC ATT TTC	TAT AAC TCT GCT GCA CCC C
TLR4	CCATGGCCTTCCTTTCCTAC	AGAAGGGAATGTTGTCAGGGA
IL1B	CTTGTCAGTCGTTGTGG CTC	TGCTACCTGCATCACACTCA

1. táblázat Primerek szekvenciája

4.3.4. A qPCR módszere

A qPCR segítségével a fluoreszcens jelölésnek köszönhetően a templát amplifikációja valós időben megmérhető. Az amplifikációs görbén nyomon követhetjük ezt a folyamatot, ugyanis ahogy az amplikon mennyisége nő, a fluoreszcencia erőssége is úgy növekedik minden PCR-ciklus után elvégzett mérés alkalmával. Egy küszöbérték van meghatározva, amelyet átlépve már értelmezhető a fluoreszcens jel erőssége a háttéren. Azt a ciklusszámot, aminél a jel átlépi ezt a küszöbértéket Ct értéknek nevezzük. Minél kisebb a Ct érték, annál magasabb a kezdeti templát koncentráció. Leggyakrabban a Taq-man próbát, esetleg SYBR Green-t alkalmaznak a qPCR kivitelezéséhez. A qPCR-t számos területen alkalmazzák, például diagnosztikai célokra, génexpressziós vizsgálatokra, genetikai tesztekhez.

Kísérletünkben SYBR Green PCR Master Mix-et használtunk a qPCR során. A kvantitatív PCR során 60 ciklusos amplifikációt végeztünk, amelynek a ciklus-programja a következő 1, Preinkubáció – 90°C – 900 sec; 2, Denaturáció – 95°C – 15 sec; 3, Primer tapadása – 62°C -20 sec; 4, Lánchosszabbítás – 72°C – 15 sec

4.4. Statisztikai módszerek

A statisztikai kiértékelést Past statisztikai programmal végeztem, majd az adatokat Excel táblázatba gyűjtöttem össze, rendszereztem és tároltam. A diagramokat Excel programban készítettem el.

A biokémiai paraméterek vizsgálatához Kruskal-Wallis tesztet futtattam, hogy megállapítsam, hogy van-e statisztikailag szignifikáns különbség a három etetést tekintve eltérő csoport között. A nemparametrikus próbára szükség volt a minták kis elemszáma miatt. A csoportok egymással történő összehasonlítását Dunn's post hoc tesztel végeztem. Két szempont alapján történt az összehasonlítás. Az egyik az idő: összehasonlítottam az 0, 5 és 10 hetes időpontokon belül a különböző csoportok értékeit, így megkapva a csoportok közötti különbségeket. A másik szempont az volt, hogy eltérő időpontokban hasonlítsam össze a csoportokat önmagukkal, így hozzájutva ahhoz, hogy csoporton belül hogyan alakultak az értékek az idő múlásával.

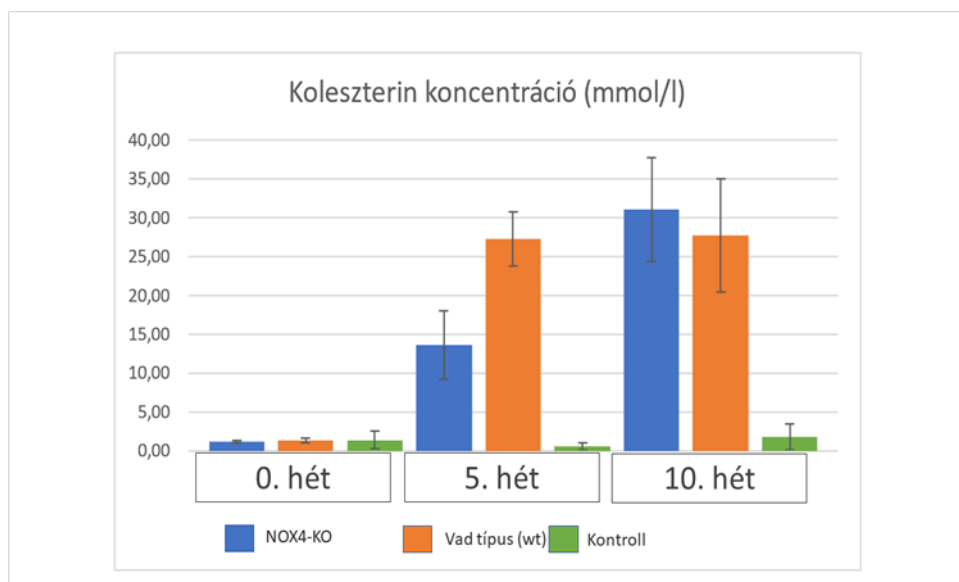
A génexpressziós eredmények statisztikai értékeléséhez Mann-Whitney-próbát használtam, szintén nemparametrikus tesztet az említett ok miatt. Ebben az esetben egyrészt összehasonlítottam a *NOX4* génkiütött állatok csoportját a vadtypussal 0, valamint 10 hetes időpontokban. Másrészt pedig összehasonlítottam a *NOX4* génkiütött csoportot, valamint a vadtypust önmagával 0 és 10 hetes időpontok között.

V. Eredmények

5.1. Biokémiai paraméterek

A koleszterin koncentráció (3. ábra) mindhárom csoportban hasonlóan alakult a kísérlet kezdetekor és a kontroll csoportban ez nem is változik a kísérlet teljes ideje alatt. A kísérlet 5. hetén a vad típusú koleszterin-kiegészítést tartalmazó takarmánnyal etetett állatokban a kontroll csoporthoz viszonyítva szignifikánsan nagyobb szérumszint volt mérhető ($p=0,000711$). Ez az emelkedett érték a vad típusú csoportban megmarad az etetési periódus végéig (az eltérés a kiindulási értékhez képest itt is szignifikáns ($p=0,0186$)). Ez egyben szignifikánsan ($p=0,03251$) nagyobb a kontroll értéknél.

A *NOX4-KO* kísérleti csoport esetében a koleszterin koncentráció változásának dinamikája ettől eltérő. A 10. hét végére itt szignifikáns emelkedést látunk ($p=0,000407$), azonban a kísérlet félidejében a koleszterin koncentráció emelkedése még nem számottevő. A 10. héten, a *NOX4-KO* egyedek szérumszintje számottevően meghaladja a kontroll csoport értékeit ($p=0,003197$).



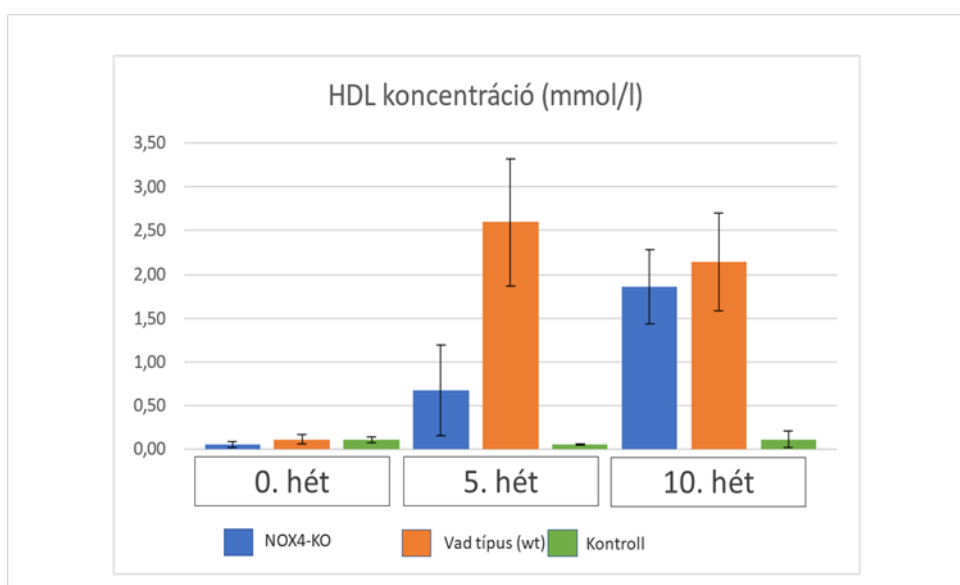
3. ábra A koleszterin koncentráció alakulása a kísérlet során

A HDL esetében (4. ábra) a koleszterinszint változásához hasonló mintázatot figyeltünk meg. A kísérlet kezdetén nincs szignifikáns eltérés a csoportok között. A koleszterin-etetés során a HDL szintje mindkét etetett csoportban nő, azonban a *NOX4-KO*

csoport esetében az 5. héten mérsékelt emelkedés figyelhető meg (mely nem tekinthető szignifikánsnak), szemben a vad típusú etetett csoporttal, ahol az emelkedés mértéke szignifikáns már az 5. héten ($p=0,01738$) és a magas HDL szint megmarad a 10. hétre is. A *NOX4-KO* csoport esetében a 10. hétre az emelkedés mértéke közelít a vad típusban mért értékhez, de az emelkedés mértéke elmarad attól, így a 10. héten az etetett csoportok között (*NOX4-KO* és wt) szignifikáns különbség van ($p=0,01485$). A nem etetett kontroll csoportban a HDL értéke nem változik szignifikánsan és eltér az etetett csoportoktól ($p=0,009925$). A kontroll csoport esetében nem volt szignifikáns változás a kísérlet időtartama alatt.

A HDL esetében 0 hetes korban nem található szignifikáns eltérés a csoportok között, illetve a kontroll csoportban a kísérlet teljes ideje alatt hasonló értékeket mértünk. A kísérleti időszak 5. hetében látható, hogy a vad típusban jelentősen megemelkedett a HDL-tartalom, amely mind a *NOX4-KO* ($p=0,04311$), mind a kontroll ($p=0,005349$) csoporthoz viszonyítva szignifikánsnak bizonyult. A 10. héten a vad típusú állatokban a koncentráció továbbra is szignifikánsan ($p=0,009925$) nagyobb a kontrollnál, azonban ekkor már a *NOX4-KO* csoport értéke is számottevően ($p=0,01485$) meghaladja azt.

Megvizsgálva a különböző időpontokban mért értékeket a *NOX4-KO* nyulakban a koncentráció növekedése a 0. és 10. hét között bizonyult számottevőnek ($p=0,0009077$). A vad típus esetében ezzel szemben már az 5. hétre szignifikánsan nagyobb ($p=0,01738$) a HDL koncentráció, amely a kísérlet végére valamelyest mérséklődik és így az eltérés sem a 0. sem az 5. heti értékekhez viszonyítva nem számottevő.

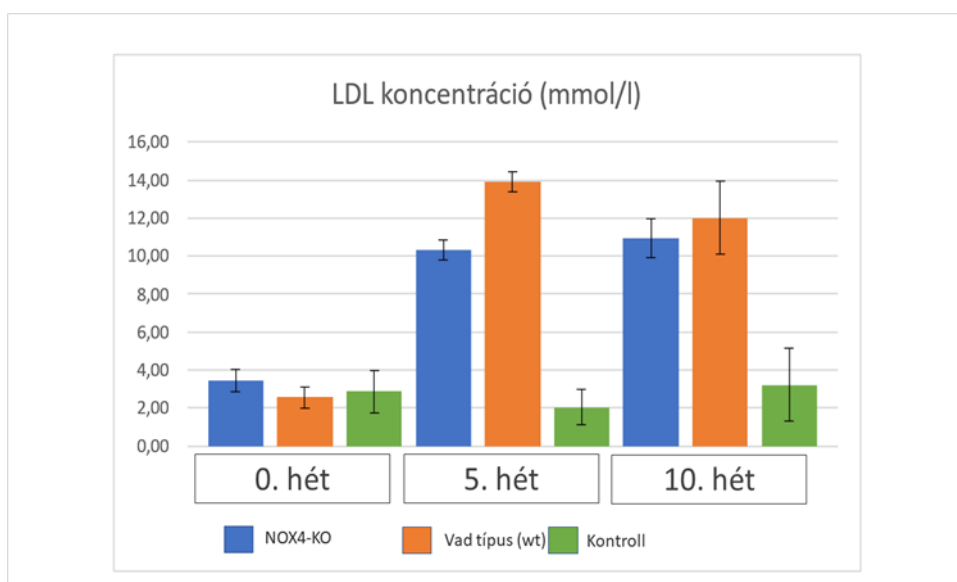


4. ábra A HDL koncentráció alakulása a kísérlet során

Hasonlóan a koleszterin és a HDL koncentrációhoz, az LDL koncentráció (5. ábra)

esetében sincs eltérés a csoportok között a kísérlet indulásakor és a kontroll csoportban közel azonos értéket mértünk minden mintavétel alkalmával. A kísérlet 5. hetén mindkét emelt koleszterin-tartalmú takarmányt fogyasztó csoportban nagyobb LDL koncentrációt mértünk a kontrollhoz viszonyítva, azonban ez csak a vad típus esetében bizonyult szignifikánsnak ($p=0,0007014$). A 10. héten már mindkét kísérleti csoport LDL koncentrációja számottevően meghaladja a kontroll értéket ($NOX4-KO$ $p=0,01485$, vad típus $p=0,009925$).

Mind a $NOX4-KO$, mind a vad típusú nyulakban szignifikánsan nőtt az LDL koncentráció a koleszterin-terhelés hatására az 5. hétre (az előbbi csoportnál $p=0,02454$, az utóbbinál $p=0,009467$). Az 5. és 10. hét között bár a $NOX4-KO$ csoportban némiképp nőtt, míg a vad típusú csoportban valamelyest visszaesett a szérumban lévő LDL-tartalom, összességében ebben az időszakban számottevő változás a csoportokon belül nem történt. Az egyes csoportok LDL koncentrációját a 0. és 10. heti mintákban összehasonlítva mindkét csoportban emelkedett, azonban csak a $NOX4-KO$ csoport esetében szignifikáns ($p=0,00234$) az eltérés.

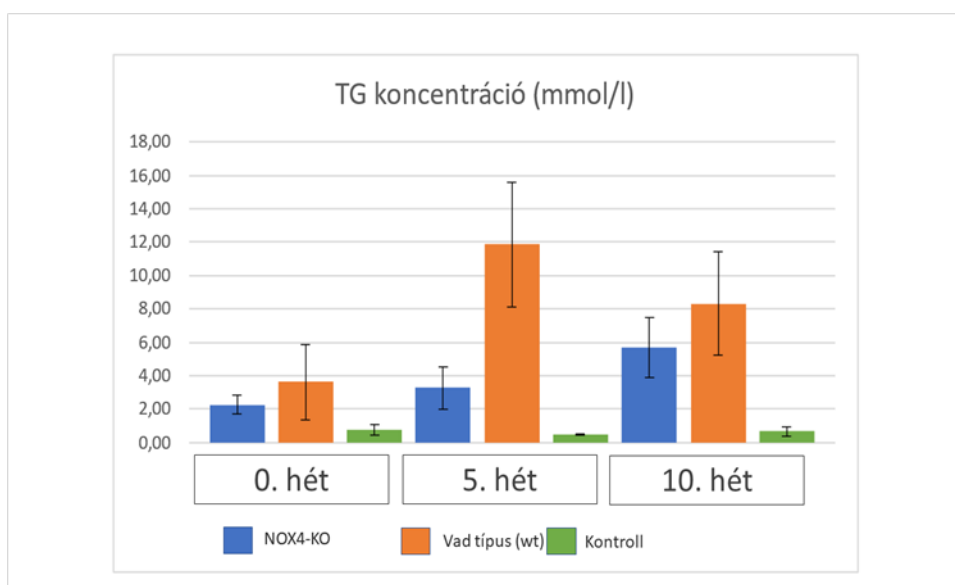


5. ábra Az LDL koncentráció alakulása a kísérlet során.

A kontroll egyedekben mért triglicerid koncentráció (6. ábra) a 0. napon statisztikailag szignifikáns mértékben eltér a $NOX4$ génkiütött nyulak értékeitől ($p=0,02334$), és a vad típustól ($p=0,003283$). 5 hetes korban az eltérés még szembetűnőbb. Elsősorban a vad típus és a kontroll csoport között figyelhetünk meg erős szignifikáns különbséget ($p=0,0007014$). A kontroll és a $NOX4-KO$ értékek közötti különbség ugyan nőtt a kiindulási értékhez viszonyítva, azonban ez statisztikailag nem igazolható. A kezelés 10. hetében, bár a csoportok közötti eltérések kevésbé markánsak, de a 0. mintavételhez hasonlóan mégis szignifikánsan nagyobb mind a NOX génkiütött ($p=0,02334$), mind a vad típusú ($p=0,003283$) csoportban a

TG-koncentráció a kontrollhoz viszonyítva.

Az etetési időszak 10 hetében a *NOX4-KO* és a vad típusú csoportban egyaránt jelentősen nőtt a triglicerid koncentráció. A növekedés előbbi csoportban lassúbb dinamikát mutat, ezért csak a 0. – 10. mintavétel között bizonyult szignifikánsnak ($p=0,002361$). A vad típusú nyulakban azonban a változás gyorsabban zajlik, ezért az eltérés már a 0 és 5. hét időpontjai között statisztikailag igazolható ($p=0,008107$), a továbbiakban pedig már visszaesés figyelhető meg, amely azonban nem számottevő. A kontroll csoportban egyik időpontban sem volt statisztikailag szignifikáns eltérés.

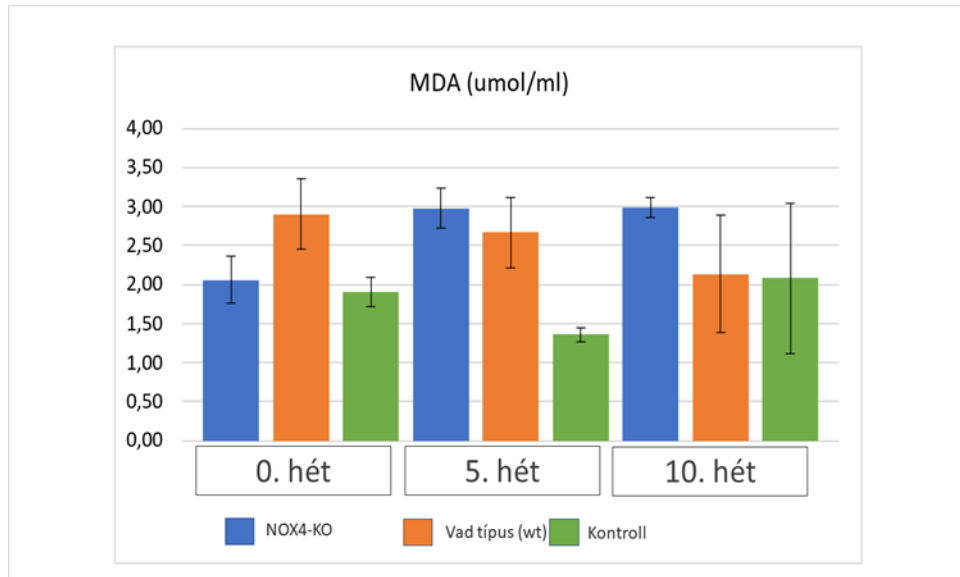


6. ábra Triglicerid koncentráció alakulása a kísérlet során

A malondialdehid koncentráció (7. ábra) esetében, a vad típusú egyedekben szignifikánsan nagyobb értéket mértünk a kísérlet indulásakor, mint a *NOX4-KO* ($p=0,02973$) kontroll ($p=0,004875$) nyulak szérumban. 5 héttel az etetés megkezdését követően a *NOX4-KO* csoportban volt a legnagyobb az MDA koncentráció, amely a kontroll csoport értékével összehasonlítva statisztikailag is igazolható eltérést jelentett ($p=0,00194$). A 10. héten a *NOX4-KO* egyedekben továbbra is nagy MDA koncentráció volt mérhető, míg a vad típusú és a kontroll egyedek értékei hasonlóan alakultak, és elmaradtak a génkiütött nyulak értékeitől. Az eltérés a vad típus és a *NOX4-KO* csoportok között statisztikailag is igazolható mértékű volt ($p=0,03251$).

Az egyes kísérleti csoportokban vizsgálva a malondialdehid koncentráció változásait megállapítható, hogy a *NOX4-KO* nyulak esetében statisztikailag igazolható mértékben nőtt az 5. hétre ($p=0,04771$), majd ezen a szinten stabilizálódott 10 hetes etetési időszak végéig. Mindez azt is jelenti, hogy a kiindulási és a 10. héten mért MDA koncentráció szignifikánsan

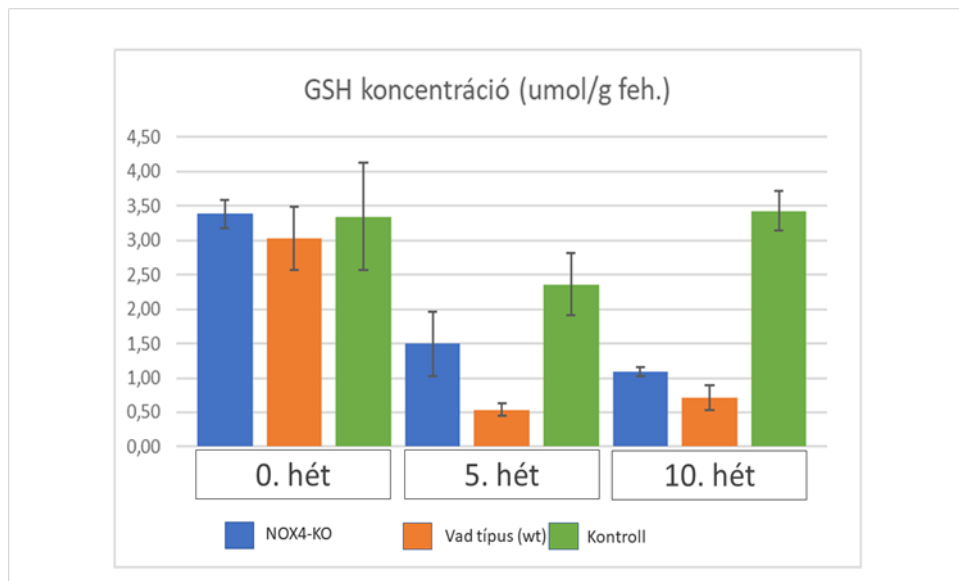
($p=0,0008893$) eltért egymástól. A vad típus esetében az MDA koncentráció folyamatosan csökken, azonban a nagy egyedi variancia miatt a változások statisztikailag nem számottevőek. A kontroll, koleszterin-kiegészítést nem fogyasztó csoportban a 0. 5. hét között ($p=0,004678$) statisztikailag igazolható eltérés figyelhető meg, a 0. és 10. hét, ill. az 5. és 10. hét között azonban nem látunk eltérést.



7. ábra Az MDA koncentráció alakulása a vérérszérumban

A redukált glutation (8. ábra) esetében nem volt szignifikáns eltérés a kísérlet kezdetén a vizsgálati csoportok között. Az emelt koleszterin-tartalmú takarmány etetésének 5. hetén azonban a vad típus szignifikánsan eltért a kontroll csoporttól ($p=0,001184$) és ez az eltérés a 10. hétig meg is maradt ($p=0,000711$).

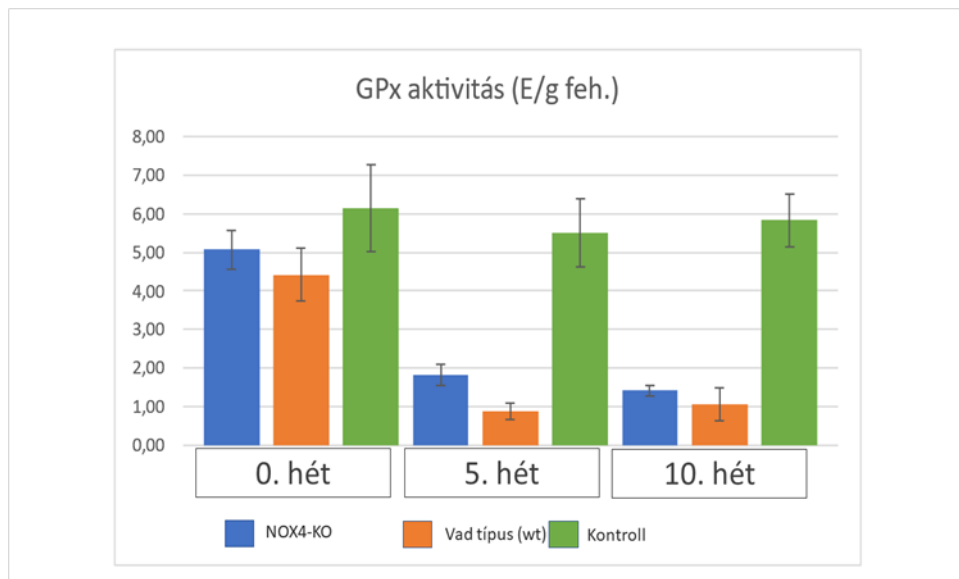
A NOX4-KO nyulak esetében 5. hétre statisztikailag szignifikáns ($p=0,03389$) csökkenés következett be, amely a 10. hétre ugyan nem szignifikánsan, de tovább csökkent. A vad típusban a redukált glutation koncentráció az 5. hétre hasonlóképpen statisztikailag szignifikánsan csökkent, ezt követően azonban közel azonos szinten maradt. A kontroll csoport mintáiban a vizsgált időszakban a GSH-koncentráció ugyan mutatott némi ingadozást ez statisztikailag nem igazolható.



8. ábra A GSH koncentráció alakulása a vérérumban

A kísérlet kezdetén a glutation-peroxidáz aktivitás (9. ábra) a kontroll csoportban volt a legnagyobb, amely a vad típus egyedeiben mért értékhez viszonyítva szignifikáns eltérést jelentett ($p=0,01465$). A kísérlet 5. hetében az eltérések hasonló, markánsabb mintázatot adtak. Ekkor mindkét koleszterin-kiegészítést fogyasztó csoportban számottevően kisebb volt a kontroll értéknél. A vad típus és kontroll csoport ekkor is szignifikánsan eltért egymástól ($p=0,000711$). A 10. héten a *NOX4*-KO nyúl csoport ($p=0,02334$), valamint a vad típus ($p=0,003283$) esetében is szignifikánsan kisebb a GPx aktivitása a kontroll egyedekben mért értékhez viszonyítva.

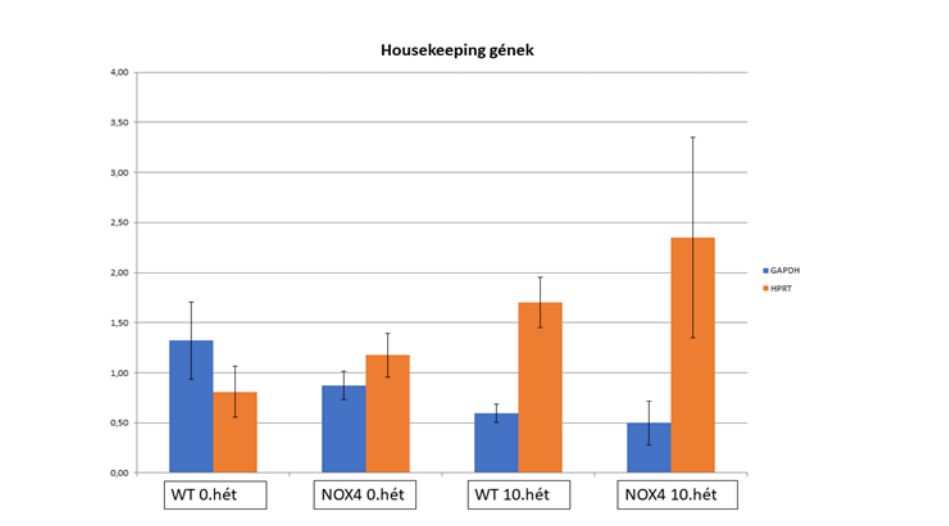
A *NOX4*-KO nyulak esetében a glutation-peroxidáz aktivitás statisztikailag szignifikánsan csökkent a 0. és 5. hét között ($p=0,04771$), majd a 10. hét közel azonos szinten maradt. A vad típus esetében hasonló szignifikáns változást láthatunk az etetési időszak első felében ($p=0,01051$), amely az aktivitás csökkenése a kísérlet végére mérséklődik. A kontroll csoport esetében az enzimaktivitás nem változik szignifikáns mértékben a kísérlet ideje alatt.



9. ábra Glutation-peroxidáz aktivitás alakulása a kísérlet során

5.2. Génexpresszió vizsgálata

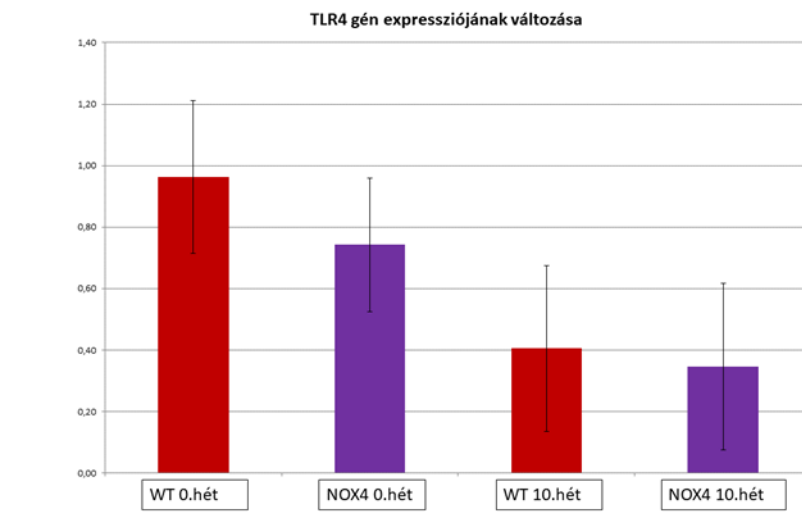
A housekeeping gének közül (10. ábra) a GAPDH-t tekintve sem a *NOX4*-KO sem pedig a vad típus értékei között nem található statisztikailag szignifikáns eltérés. A *HPRT* értékeiben ezzel szemben az figyelhető meg, hogy a vad típus, valamint a *NOX4*-KO nyulak esetében is szignifikáns az eltérés a 0 és 10. heti időpontok között. Emiatt a GAPDH-t választottuk a relatív expresszió kifejezésére, mivel az „stabilabb” pontot feltételez.



10. ábra A housekeeping gének expressziója

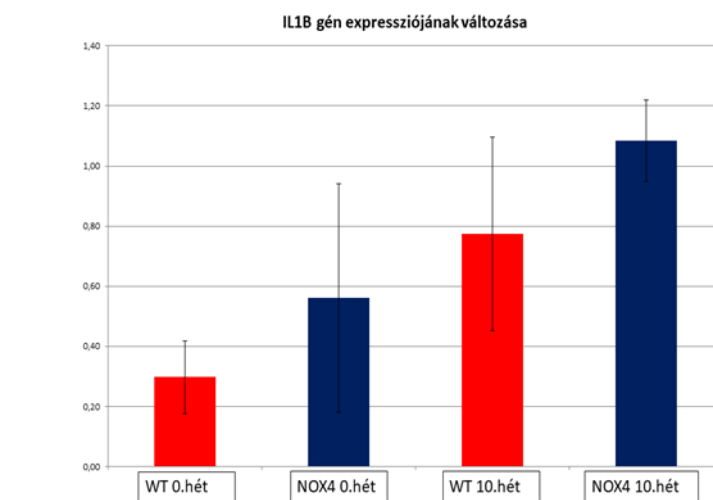
A TLR4 esetében (11. ábra) azt lehet megfigyelni, hogy 0 hetes időpontban a *NOX4* és a vad típus között statisztikailag szignifikáns eltérés van ($p=0,019964$), amely a 10. heti időpontra kiegyenlítődik. Emellett az is látható, hogy a 0. és 10. időpont között szintén

statisztikailag szignifikáns csökkenés van ($p=0,029401$).



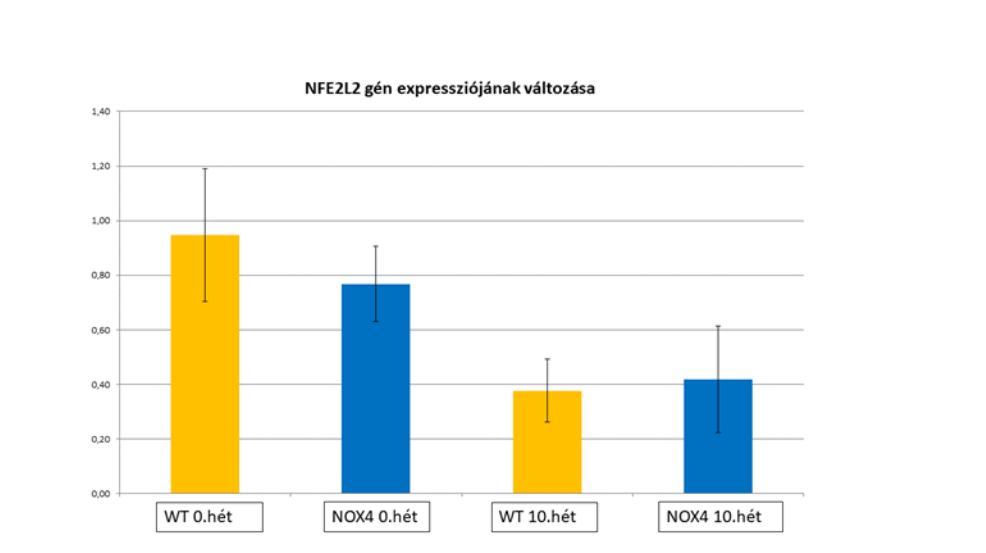
11. ábra A TLR4 gén expressziója

Az IL1B esetében (12. ábra) az figyelhető meg, hogy statisztikailag szignifikánsan növekszik a *NOX4* génkiütött nyulak 0. és 10. időpont közötti expresszió.



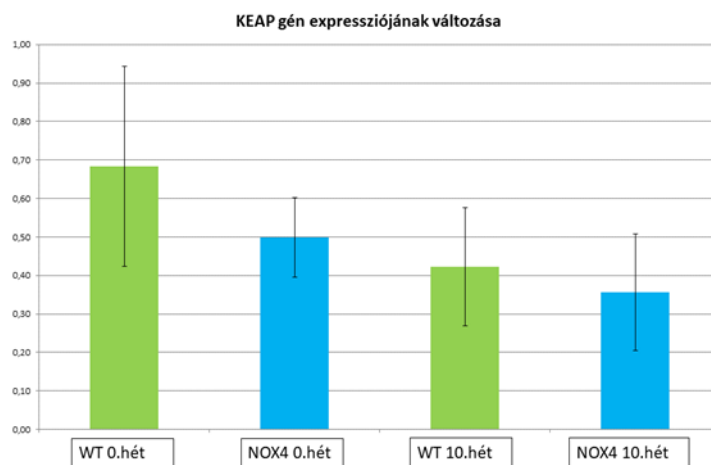
12. ábra Az IL1B gén expressziója

Az NFE2L2-t megfigyelve (13. ábra) az látható, hogy mind a *NOX4* génkiütött nyulak esetében ($p=0,011925$), mind pedig a *NOX4* génkiütött nyulak esetében ($p=0,030383$) statisztikailag szignifikáns csökkenés következett be.



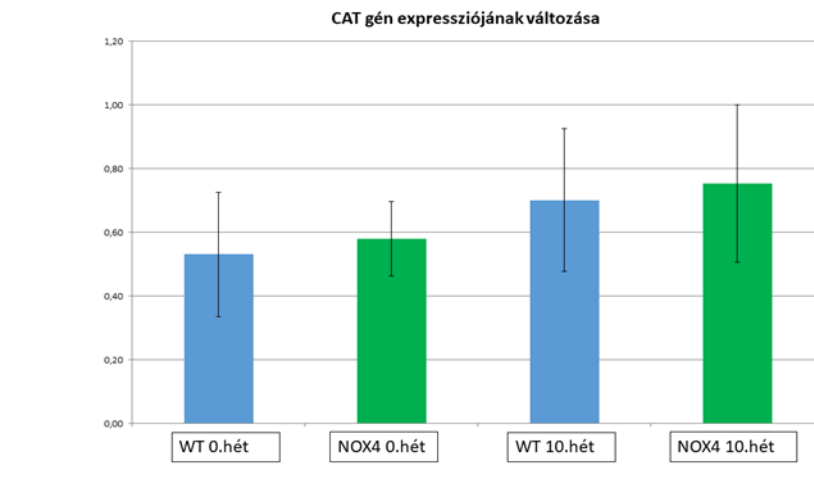
13. ábra Az NFE2L2 gén expressziója

A KEAP génexpresszióját tekintve (14. ábra) megfigyelhetjük, hogy a 0 és 10. időpont között van statisztikailag igazolható csökkenés a vad típus csoportban ($p=0,030383$). A többi paramétert összehasonlítva nem lehet látni statisztikai eltérést.



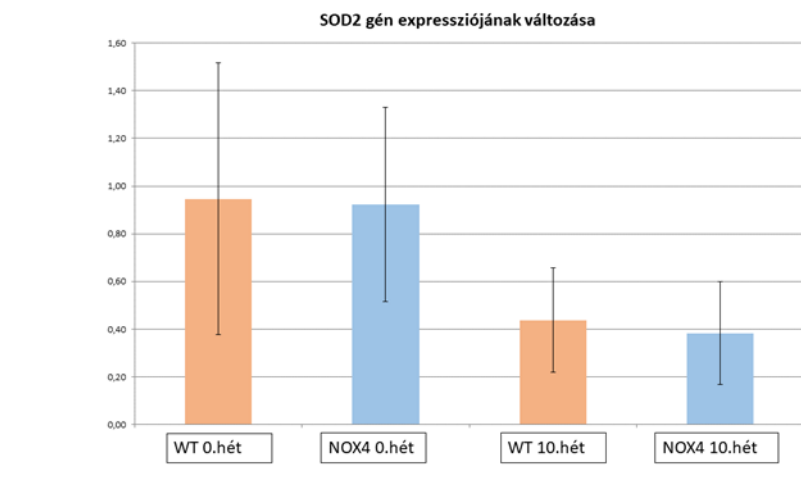
14. ábra A KEAP gén expressziója

A CAT génexpressziós szintjei esetében (15. ábra) nem látható statisztikailag szignifikáns különbség.



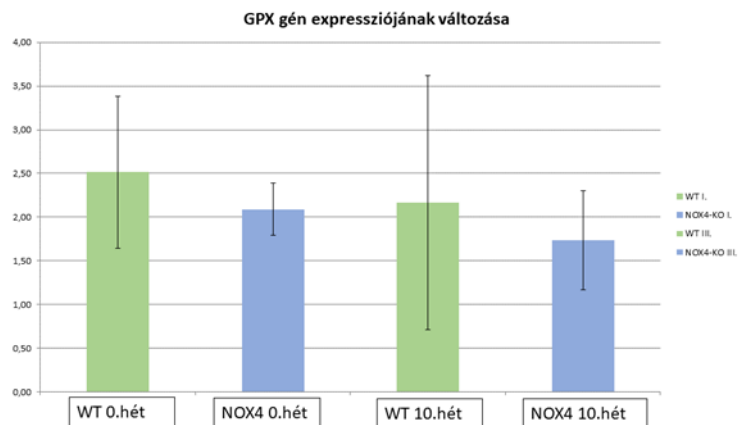
15. ábra A CAT gén expressziója

Nincsen statisztikailag értékelhető különbség a SOD2 esetében (16. ábra) az egyes csoportok és időpontok között.



16. ábra A SOD2 gén expressziója

A GPX tekintetében (17. ábra) nem figyelhetünk meg statisztikailag igazolható eltérést.



17. ábra A GPX gén expressziója

VI. Diskusszió, új tudományos eredmények

6.1. A szérum zsír összetételének változásai

A kontroll, azaz hozzáadott koleszterint nem tartalmazó keveréktakarmánnyal etetett csoportban nem látható statisztikailag szignifikáns változás a 10 hetes periódusban sem az összes koleszterin, sem a HDL, LDL, illetve triglicerid szint vonatkozásában.

A kísérleti csoportokban a koleszterin és a HDL koncentráció a kísérlet ideje alatt jelentős változást mutat. Mindkét paraméter, mindkét csoportban emelkedik az etetési időszakban. Azonban fontos szempont, hogy a változások dinamikája a két csoport esetén eltérő. Míg a vad típusú állatokban a koleszterin és a HDL koncentráció is szignifikánsan megnő már az 5. hétre és ezen a szinten stabilizálódik, addig a *NOX4-KO* csoportban a koncentráció növekedése mindkét paraméter esetében lassúbb folyamat, így szignifikáns eltérést csak a 10. héten mutat. Az LDL koncentráció esetében a két csoportban hasonló mértékű és hasonló ütemű növekedést tapasztaltunk.

A fentiek alapján a *NOX4-KO* genotípus esetében, feltételezzük a *NOX4* hiány érlemeszesedést fokozó (mértékében és/vagy kifejlődésének gyorsaságában) hatását.

A *NOX4-KO* genotípus esetében a HDL szint emelkedése elmarad a vad típustól, ***ennek magyarázatára két lehetséges, de egy irányba mutató hipotézist állítottunk fel.***

Az ***első hipotézisünk*** szerint feltételezzük, hogy a *NOX4* gén hiánya csökkenti a koleszterin fehérjéhez kapcsolódását, azaz a HDL-képződést és ennek következtében a periféria koleszterin mentesítése gyengébb hatásfokú, amely hozzájárulhat az ateroszklerózis kialakulásához.

A ***második hipotézisünk*** szerint a vérben keringő HDL nagyobb mértékben ürül a szervezetből és ezért tapasztaljuk az alacsonyabb szérum HDL szintet a *NOX4-KO* állatok esetében.

A két lehetséges hipotézis tesztelése további vizsgálatokat igényel, melyek során az érben keletkező plakkok összetételének, illetve a plakkosodás mértékének, továbbá a máj anyagcseréjének vizsgálata tovább árnyalhatja az eredményeinket.

6.2. Az oxidált LDL által indukált TLR4 által közvetített oxidatív változások

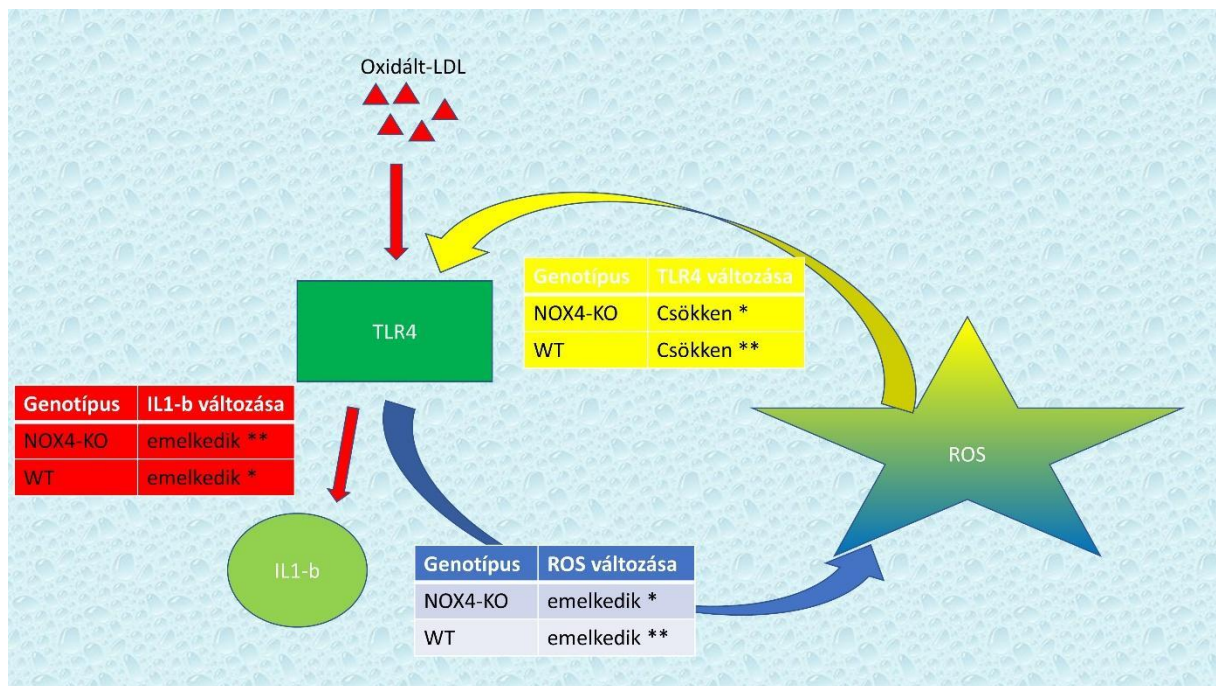
A TLR4 által mediált ROS képződést a receptor-ligand kölcsönhatás váltja ki (Miller, 2005), ami egészséges állat szervezetében. Tehát ahol hiányzik, vagy nagyon alacsony a TLR4 különböző ligandjainak a koncentrációja, abban az esetben nem indukálódik a folyamat.

Vizsgálataink alapján a TLR4 expressziójának szintje szignifikánsan alacsonyabb a NOX4-KO csoport esetében (a kísérlet kezdetekor). TLR4 által indukált ROS termelés egyik forrása a NOX enzimek által termelt ROS, aminek szintje feltételezhetően alacsonyabb a NOX4 gén kiütésének következtében. A ROS szint emelkedése ugyanakkor negatívan szabályozza a TLR4 expresszióját, tehát ha egy rendszerben alacsonyabb a ROS szintje, akkor azt várjuk, hogy a TLR4 expressziója csökken. Vizsgálataink során ennek éppen az ellenkezőjét tapasztaltuk a „kezeletlen” NOX4-KO csoport viszonylatában. A ROS szint tényleges eltéréseinek, változásának vizsgálata lényeges információt hordoz, ezért ennek vizsgálat fontos lehet a további vizsgálatok tervezésekor.

A koleszterin-kiegészítés során nő a keringésben mind az összes koleszterin, mind az LDL mennyisége, ezt a vizsgálataink során is így tapasztaltuk. Tudjuk azt is, hogy az LDL-ből a szervezetben keletkezik oxidált LDL (oxLDL), ami a TLR4/CD14 komplexen keresztül szignáltranszdukciós utakat aktivál, melynek következtében oxidatív burst jelentkezik, azaz nagy mennyiségű ROS képződése történik az érintett sejtekben (18. ábrán kék színnel jelölve) (Peluso, 2012).

A ROS szint emelkedése a TLR4 receptor expressziójának csökkenését idézi elő (18. ábra), ezt a korábban már leírt összefüggést, a mi adataink is alátámasztják. A TLR4 expressziójának csökkenése eredményeink alapján kifejezettebb a vad típusú csoportban, aminek magyarázata a NOX4 hiány miatti alacsonyabb ROS képződés lehet (18. ábrán sárga színnel jelölve).

Ezzel párhuzamosan a kezdeti TLR4 által mediált indukció következtében a citokinek expressziója fokozódik, ennek a folyamatnak/aktivációnak az egyik markere az IL1-beta, melynek növekedését megfigyeltük a 10 hetes kezelés végére -párhuzamosan a TLR4 expressziós szintjének csökkenésével- mind a NOX4-KO mind a WT csoportokban. Ugyanakkor csak a NOX4-KO csoport esetében volt szignifikáns az IL1-beta szint emelkedése. Ennek a némileg kifejezettebb emelkedésnek a hátterében feltételezéseink szerint a NOX4 génkiütés következtében fennálló alacsonyabb ROS képződés és az ezzel összefüggő alacsonyabb TLR4 aktivitás állhat (18. ábrán piros színnel jelölve).



18. ábra Az oxidált LDL által indukált TLR4 által közvetített oxidatív változások

6.3. Az antioxidáns rendszer aktiválódása

A glutation-redox rendszer jellemzésénél a vad típusban és a kontrollban a változás ugyan olyan tendenciát mutat. Egyértelműen látszik, hogy 5. és 10. hétig fokozatosan csökken a GSH és GPx aktivitás. Amely teljesen ésszerű változás, hiszen a GSH szubsztrátja a glutation-peroxidáznak. Ezzel szemben az MDA koncentráció közel állandó vagy növekszik az idővel. Ezt okozhatja az, hogy a koleszterin bevitel elindít egy gyors oxigén gyök képződést, amire aktiválódik a glutation-redox rendszer, de az 5. hétre már ez a rendszer feltételezéseink szerint kimerülhet. Ezért az új kísérletek beállításakor szem előtt fogjuk tartani, hogy gyakoribb mintavételre van szükség a kezdeti stádiumban. Mivel a vad és NOX4 hasonló dinamikával rendelkezett, ezért azt feltételezzük, hogy a génkiütés a glutation-redox rendszert nem érinti.

A védelmi vonal azonban kimerül, erre utal, hogy a kontroll csoport esetében a kezelés teljes hossza során a kiindulási szint közeli értékeket mértünk a GSH és GPx esetében. A 0. héten mért eredmények esetében nincsen eltérés, így a változás reprezentatívnak nevezhető. Terveink szerint az oxidatív gyökök mennyiségét is mérjük a következő kezelések során az oxidatív stressz pontosabb igazolása érdekében.

A növekvő LDL szintre mindkét csoport egyedeinek vérparaméterei (NOX4-KO, vad típus) úgy reagáltak, hogy csökkenő tendenciát követett a legtöbb gén expressziója. A lehetséges ok a tapasztalat háttérében (a növekvő LDL szintre reagálva) az állhat, hogy a

NOX4 génkiütése esetén a KO állatokban mindig alacsonyabb a ROS termelés, amely negatív feedback-el csökkenti a kaszkárendszerben résztvevő többi tag expresszióját is. Azonban a vad típusnál csökkenő génexpressziós értékek magyarázatának feltárásához további vizsgálatok lefolytatása szükséges.

A kataláz esetében a vad típusú csoportnál az expresszió növekvő tendenciát követ, a *NOX4*-KO csoport értéke csökkent. Ez arra enged következtetni, hogy a kataláz aktivitásának növekedése szükséges volt a növekvő ROS termelés miatt, amely a *NOX4* génkiütés hatására igazolhatóan csökken.

Az NFE2L2 és a KEAP1 két kulcsfontosságú fehérje, amelyek részt vesznek a sejtek oxidatív stresszre adott válaszában. Fiziológiai körülmények között a KEAP1 az NFE2L2-höz kötődik. Amikor azonban a sejtek oxidatív stressznek vannak kitéve, a KEAP1 oxidálódik és disszociál az NFE2L2-ről, lehetővé téve az NRF2 számára, hogy bejusson a sejtmagba és aktiválja az antioxidáns védelemben és méregtelenítésben részt vevő géneket. Köztük a katalázt, a szuperoxid dizmutázt, a glutation peroxidázt, melyek expressziójában nem tapasztaltunk eltérést/változást a vizsgálataink során. A génexpresszió mértéke azonos volt a koleszterin-kiegészítés kezdetén és a 10 hetes etetési periódus végén. Azonban ez nem zárja ki azt a lehetőséget, hogy a kezelés következtében változott a gének expressziója.

Érdekes lehet az is, hogy a változás milyen dinamika mentén történik. Ennek részletesebb elemzése további vizsgálatok tárgya. Köztes időpontban, az 5. héten történt mintavétel. Ezen minták feldolgozása még folyamatban van. Azonban valószínűleg szükség lesz további köztes időpontokban történő mintavételekre, ha az antioxidáns enzimek expressziós változásának pontosabb mintázatait és a *NOX4* enzim hiányának következményeit alaposabban fel szeretnénk tárni az érlelmeszedés e nyúlmodelljében.

Érdekes eredmény, hogy a kísérleti modellünkben megfigyeltük az NFE2L2 és a KEAP1 expressziójának csökkenését a kiindulási értékekhez képest a 10 hetes koleszterin-etetés végére. Ezt a jelenséget már korábban is leírták, miszerint a hosszan tartó oxidatív stressz mind az NFE2L2, mind a KEAP1 expressziójának csökkenéséhez vezethet.

Ez feltehetően azért következik be, mert az elhúzódó oxidatív stressz magukat a fehérjéket is károsíthatja. Beleértve a fehérjék oxidációját és a degradációt, ami a szintek csökkenéséhez vezet. Ezen kívül epigenetikai változásokhoz (például DNS metiláció, hiszton módosulások) vezethet (Bhat, 2018; B. Zhang, 2016). Ez érintheti az NFE2L2-t és a KEAP1-et kódoló gének promóter régióját is. Erre vonatkozó utalások vannak a szakirodalomban (S. Zhang, 2022) ahol leírják, hogy az epigenetikai módosítások befolyásolhatják a transzkripciós faktorok hozzáférhetőségét a promóter régióhoz. Így végső soron gátolják a génexpressziót,

ami csökkent aktivitáshoz vezet. Emiatt a hosszan tartó, vagy súlyos oxidatív stressz mindkét fehérje expressziójának csökkenéséhez vezethet, maguknak a fehérjéknek a károsodása és az epigenetikai változások miatt. Ennek vizsgálata, az epigenetikai mintázat változásainak leírása és összehasonlítása szintén terveink között szerepel.

6.4. További javaslatok

Irodalmi adatokból ismert, hogy a vér sejtjes elemeiben típusonként eltérő az antioxidáns aktivitás szintje. A neutrofil granulocitákban például magasabb a szuperoxid-dizmutáz és kataláz transzkriptumok szintje, mint a monocitákban vagy makrofágokban. Azonban a SOD fehérje szintje hasonló, míg a kataláz aktivitása magasabb a neutrofilekben. A *GPX* expressziója és aktivitása és a GSH-tartalom magasabb a monocitákban, mint a neutrofil granulocitákban (Pietarinen-Runtti, 2000).

Vizsgálataink során a vér összes sejtjes eleméből preparált mintán végeztük az elemzéseinket, így a vér különböző sejtpopulációinak összeadott értékeit mérjük, a tényleges változás akár ellentétes is lehet az eltérő fehérvérsejtpopulációk között. A különböző fehérvérsejtpopulációk szortírozása a sejtfelszíni markereik alapján az ún. flow citometria módszerével lehetővé teszi, hogy az egyes populációkat egymástól elkülönítve vizsgáljuk.

A *NOX4*-ről egyes vizsgálatok alapján feltételezik, hogy az érrelmeszesedéssel összefüggésben ateroprotektív tulajdonságokkal is rendelkezik. A szuperoxid helyett egy másik ROS-prekurzort, hidrogén-peroxidot szabadít fel, ami nem lép kölcsönhatásba a nitrogénoxiddal. Ennek következtében a *NOX4* nem fokozza a peroxinitrit keletkezését (Di Marco, 2016; Schröder, 2012).

Az ér simaizomsejtek (VSMC) proliferációja központi szerepet tölt be az érrelmeszesedés kialakulásában ennek gátlása, tehát érvédő hatású. A *NOX4* által felszabaduló hidrogén-peroxid képes csökkenteni a VSMC proliferációs arányát, így gátolja az érrendszeri remodellinget és a gyulladást, valamint képes fenntartani az eNOS és a heme-oxigenáz-1 expresszióját érrendszeri stresszhelyzetben (Fulton, 2016). Ezzel szemben szívhipertrófiás és ischaemiás stroke rágcslómodellben a *NOX4* káros hatását mutatták ki (Nishimura, 2016). A hidrogén-peroxid, valamint más ROS-ok egyszerre hathatnak védő és károsító hatásúként, ami függhet a sejttípustól, a ROS mennyiségétől és szubcelluláris elhelyezkedésétől.

VII. Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni kitartó, kedves és precíz szakmai munkáját három konzulensemnek, Balláné dr. Erdélyi Mártának, dr. Bodrogi Lillának és Pintér Tímeának.

Szeretném emellett megköszönni, hogy hozzáértő labormunkájával lehetővé tette a dolgozat elkészülését dr. Balogh Krisztián a biokémiai méréseivel, valamint Pintér Tímea a génexpressziós vizsgálatban betöltött kiemelkedő szerepével.

Köszönöm szépen dr. Orosz Szilviának és az ÁT. Kft munkatársainak, hogy a takarmányminták lemérésével hozzájárultak, hogy még pontosabban megértsük a háttérben lejátszódó élettani folyamatokat.

Köszönöm a MATE GBI állatházában jelenlévő minden munkatársnak, akik segítettek a nyulak szakszerű kezelésében, mintavételekben.

Köszönöm Plank Patriknak, Terényi Helgának, Csákányi Andornak, valamint Pásztor Balázsnak a sok szintetizálást szabadidőjükben, amely értékes gondolatokhoz vezettek.

Köszönöm a szakértő tanítást az összes tanáromnak, akik nélkül most nem lehetnék az, aki vagyok, és akik a helyes ösvényre tereltek, ezáltal célt adva az életemnek.

Külön köszönet illeti Dr. Ferencz Andreát, aki értékes ötleteivel és orvosi hozzáértésével véleményezte a dolgozatot. Emellett inspirált arra, hogy kialakítsam saját írási stílusomat és bátorított a humán medicina iránt érzett szeretetem kiteljesedésében.

Végezetül valamennyi említett kollégának hálával tartozom, amíg élek, hiszen olyan maradandó nyomot hagytak segítségükkel bennem, amelyet sosem fogok elfelejteni.

VIII. Mellékletek

Takarmányvizsgálati jegyzőkönyv			
Megrendelő cég neve: Major Fanni Csilla			
Eredményközlés postacíme:			
Eredményközlés e-mail címe: major.fanni.csilla@gmail.com			
Minta megnevezése: Nyúltáp Sima, 22/92			
Mintavétel dátuma: 2023.			
Vizsgálat: Alap csomag			
EREDMÉNYEK	Eredmény	Átlag*	Megj.
Mért és számított táplálóanyagok			
Száranyag	g/kg	911	
Nyersfehérje	g/kg szá.	148	
Nyerszsír	g/kg szá.	32	
Nyersrost	g/kg szá.	162	
Nyershamu	g/kg szá.	81	
Összcukor	g/kg szá.	67	
Keményítő(fotom)	g/kg szá.	141	
aNDFom	g/kg szá.	372	
ADF	g/kg szá.		
ADL	g/kg szá.		
Leboml. kem.	g/kg szá.		
Leboml. kem.	%		
NFC	g/kg szá.	367	
NSC	g/kg szá.	208	
By-pass kem.	%		
By-pass kem.	g/kg szá.		
Oldódó nyersfehérje	%	43	NORFOR,
Oldódó nyersfehérje	g/kg szá.	64	Skandinávia
Lizin	g/kg szá.		
Metionin	g/kg szá.		
Nitrát	g/kg szá.		
OMd	%	76,2	
dNDF ₄₈	g/kg szá.		
iNDF ₂₄₀	g/kg szá.		
peNDF _(USA)	g/kg szá.		
RFV _(USA)			
A CSPS-értékkel módosított hazai számított adatok			
CSPS (USA)	%		
Kem.em _{HU}	%sza.		
Em. keményítő _{HU}	g/kg szá.		
Keményítővesztés	g/kg szá.		
NEI _{HU CSPS}	MJ/kg szá.		
Magyar fehérje- és energiaértékelési rendszer (M.T. Kódex)			
MFE	g/kg szá.	89	
MFN	g/kg szá.	92	
UDP	g/kg szá.	44	
FOM	g/kg szá.	561	
DE	MJ/kg szá.	12,8	
ME	MJ/kg szá.		
NEm	MJ/kg szá.	6,74	
NEg	MJ/kg szá.	4,21	
NEI	MJ/kg szá.	6,59	

Takarmányvizsgálati jegyzőkönyv			
Megrendelő cég neve: Major Fanni Csilla			
Eredményközlés postacíme:			
Eredményközlés e-mail címe: major.fanni.csilla@gmail.com			
Minta megnevezése: Nyúltáp Kísérleti, 22/93			
Mintavétel dátuma: 2023.			
Vizsgálat: Alap csomag			
EREDMÉNYEK	Eredmény	Átlag*	Megj.
Mért és számított táplálóanyagok			
Száranyag	g/kg	906	
Nyersfehérje	g/kg szá.	162	
Nyerszsír	g/kg szá.	34	
Nyersrost	g/kg szá.	175	
Nyershamu	g/kg szá.	87	
Összcukor	g/kg szá.	47	
Keményítő(fotom)	g/kg szá.	137	
aNDFom	g/kg szá.	330	
ADF	g/kg szá.		
ADL	g/kg szá.		
Leboml. kem.	g/kg szá.		
Leboml. kem.	%		
NFC	g/kg szá.	387	
NSC	g/kg szá.	184	
By-pass kem.	%		
By-pass kem.	g/kg szá.		
Oldódó nyersfehérje	%	42	NORFOR,
Oldódó nyersfehérje	g/kg szá.	68	Skandinávia
Lizin	g/kg szá.		
Metionin	g/kg szá.		
Nitrát	g/kg szá.		
OMd	%	76,2	
dNDF ₄₈	g/kg szá.		
iNDF ₂₄₀	g/kg szá.		
peNDF _(USA)	g/kg szá.		
RFV _(USA)			
A CSPS-értékkel módosított hazai számított adatok			
CSPS (USA)	%		
Kem.em _{HU}	%sza.		
Em. keményítő _{HU}	g/kg szá.		
Keményítővesztés	g/kg szá.		
NEI _{HU CSPS}	MJ/kg szá.		
Magyar fehérje- és energiaértékelési rendszer (M.T. Kódex)			
MFE	g/kg szá.	90	
MFN	g/kg szá.	100	
UDP	g/kg szá.	49	
FOM	g/kg szá.	538	
DE	MJ/kg szá.	12,5	
ME	MJ/kg szá.		
NEm	MJ/kg szá.	6,51	
NEg	MJ/kg szá.	4,01	
NEI	MJ/kg szá.	6,42	

1. számú melléklet A takarmányok bemérése NIR módszerrel

Kód	Megnevezés	Vizsgálati érték		Megengedett vizsgálati eltérés	Vizsgálati módszer
		Eredetiben	Sz.a.-ban		
	Nedvesség g/kg	94	0,00	*	Számított érték
4	Szárazanyag g/kg	906	1 000	*	A vevő által közölt adat
20	Nyers hamu g/kg	76	84	± 5	MSZ ISO 5984 : 1992(visszavont szabvány)
5	Nyers fehérje g/kg	159	176	± 3,14	MSZ EN ISO 5983-2:2009
13	Nyers zsír "B" g/kg	46	51	± 5	MSZ 6830-6 : 1984.4.fejezet(visszavont szabvány)
10	Nyers rost g/kg	158	174	± 7,9	MSZ 6830-7:1981 (visszavont szabvány)
14	Keményítő tart. g/kg	166	183	± 5	152/2009/EK III. melléklet L.
10/a	ADF g/kg	199	219	± 10	Magyar Takarmánykódex 1990.II.8.2. 7.3 szakasz
10/c	ADL g/kg	8	9	± 5	Magyar Takarmánykódex 1990.II.8.2. 7.6 szakasz

Kód	Megnevezés	Vizsgálati érték		Megengedett vizsgálati eltérés	Vizsgálati módszer
		Eredetiben	Sz.a.-ban		
	Nedvesség g/kg	89	0,00	*	Számított érték
4	Szárazanyag g/kg	911	1 000	*	A vevő által közölt adat
20	Nyers hamu g/kg	74	82	± 5	MSZ ISO 5984 : 1992(visszavont szabvány)
5	Nyers fehérje g/kg	166	182	± 3,17	MSZ EN ISO 5983-2:2009
13	Nyers zsír "B" g/kg	44	49	± 5	MSZ 6830-6 : 1984.4.fejezet(visszavont szabvány)
10	Nyers rost g/kg	143	157	± 7,2	MSZ 6830-7:1981 (visszavont szabvány)
14	Keményítő tart. g/kg	139	152	± 5	152/2009/EK III. melléklet L.
10/a	ADF g/kg	176	194	± 9	Magyar Takarmánykódex 1990.II.8.2. 7.3 szakasz
10/c	ADL g/kg	5	5	± 5	Magyar Takarmánykódex 1990.II.8.2. 7.6 szakasz

2. számú melléklet A takarmányok bemérése Weende-i-analízissel

IX. Irodalomjegyzék

- Allain, C. C., Poon, L. S., Chan, C. S., Richmond, W., & Fu, P. C. (1974). Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clinical Chemistry*, 20(4), 470–475.
- Babelova, A., Avaniadi, D., Jung, O., Fork, C., Beckmann, J., Kosowski, J., Weissmann, N., Anilkumar, N., Shah, A. M., Schaefer, L., Schröder, K., & Brandes, R. P. (2012). Role of Nox4 in murine models of kidney disease. *Free Radical Biology & Medicine*, 53(4), 842–853.
- Bhat, A. V., Hora, S., Pal, A., Jha, S., & Taneja, R. (2018). Stressing the (Epi)Genome: Dealing with Reactive Oxygen Species in Cancer. *Antioxidants & Redox Signaling*, 29(13), 1273–1292.
- Bószé, Z., Major, P., Baczkó, I., Odening, K. E., Bodrogi, L., Hiripi, L., & Varró, A. (2016). The potential impact of new generation transgenic methods on creating rabbit models of cardiac diseases. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 121(2), 123–130.
- Brandes, R. P., Weissmann, N., & Schröder, K. (2010). NADPH oxidases in cardiovascular disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 49(5), 687–706.
- Bucolo, G., & David, H. (1973). Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes. *Clinical Chemistry*, 19(5), 476–482.
- Cao, X., Demel, S. L., Quinn, M. T., Galligan, J. J., & Kreulen, D. (2009). Localization of NADPH oxidase in sympathetic and sensory ganglion neurons and perivascular nerve fibers. *Autonomic Neuroscience: Basic & Clinical*, 151(2), 90–97.
- Chen, Q. M. (2022). Nrf2 for protection against oxidant generation and mitochondrial damage in cardiac injury. *Free Radical Biology & Medicine*, 179, 133–143.
- Czibulyás, J., Molnár, B., Pacs, I., & Csikváry, L. (1985). *Nyúltenyésztők kézikönyve* (S. Holdas, Szerk.). Mezőgazdasági Könyvkiadó.
- Csapó, J., & Csapóné Kiss, Z. (2018). *Biokémia agrármérnököknek*. Scientia Kiadó.
- Di Marco, E., Gray, S. P., Kennedy, K., Szyndralewicz, C., Lyle, A. N., Lassègue, B., Griendling, K. K., Cooper, M. E., Schmidt, H. H. H. W., & Jandeleit-Dahm, K. A. M. (2016). NOX4-derived reactive oxygen species limit fibrosis and inhibit proliferation of vascular smooth muscle cells in diabetic atherosclerosis. *Free Radical Biology & Medicine*, 97, 556–567.
- Donkó, Á. (2010). *Peroxidáz és NADPH-oxidáz enzimek működésének vizsgálata*.
- Engelking, L. R. (2010). *Textbook of veterinary physiological chemistry*. books.google.com.
- Fan, J., Kitajima, S., Watanabe, T., Xu, J., Zhang, J., Liu, E., & Chen, Y. E. (2015). Rabbit models for the study of human atherosclerosis: from pathophysiological mechanisms to translational medicine. *Pharmacology & Therapeutics*, 146, 104–119.
- Ferguson, T. L., Wales, J. H., & Lee, D. J. (1975). Cholesterol levels, atherosclerosis and liver morphology in rabbits fed cyclopropenoid fatty acid.
- Fonyó, A. (2011). *Az orvosi ételtan tankönyve*.
- Fulton, D. J. R., & Barman, S. A. (2016). Clarity on the Isoform-Specific Roles of NADPH Oxidases and NADPH Oxidase-4 in Atherosclerosis [Review of *Clarity on the Isoform-Specific Roles of NADPH Oxidases and NADPH Oxidase-4 in Atherosclerosis*]. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 36(4), 579–581.

- Gaweł, S., Wardas, M., Niedworok, E., & Wardas, P. (2004). Malondialdehyde (MDA) as a lipid peroxidation marker. *Wiadomości lekarskie*, 57(9–10), 453–455.
- Geiszt, M., Kopp, J. B., Várnai, P., & Leto, T. L. (2000). Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(14), 8010–8014.
- Geiszt, Miklós. (2011). *NADPH-OXIDÁZ ÉS PEROXIDÁZ ENZIMEK VIZSGÁLATA EMLŐS SEJTEKBEN*.
- Gippert, T., & Póka, G. (1979). *Nyúltáp-kiegészítés zsírpórával*.
- Girotti, A. W. (1985). Mechanisms of lipid peroxidation. *Journal of Free Radicals in Biology & Medicine*, 1(2), 87–95.
- Goyal, P., Weissmann, N., Rose, F., Grimminger, F., Schäfers, H. J., Seeger, W., & Hänze, J. (2005). Identification of novel Nox4 splice variants with impact on ROS levels in A549 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 329(1), 32–39.
- Gurr, M. I. (2011). *Lipid Biochemistry: An Introduction* [PDF]. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-94-009-5907-1>
- Hancock, J. T., Desikan, R., & Neill, S. J. (2001). Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways. *Biochemical Society Transactions*, 29(Pt 2), 345–350.
- Handy, D. E., & Loscalzo, J. (2017). Responses to reductive stress in the cardiovascular system. *Free Radical Biology & Medicine*, 109, 114–124.
- Hellung-Larsen, P. (1968). Lactate dehydrogenases of colostrum and milk from different species in relation to cellular content. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 27(3), 703–708.
- Holdas S., Csikváry L., & Szikora A. (1975). *A nyúltenyésztés kézikönyve* (Sándor H., Szerk.). Mezőgazdasági Kiadó.
- ISO 3656:2011 International Standard Fourth edition. Animal and vegetable fats and oils – Determination of ultraviolet absorbance expressed as specific UV extinction. International Organization for Standardization (ISO), Geneva.
- Jacobson, G. M., Dourron, H. M., Liu, J., Carretero, O. A., Reddy, D. J., Andrzejewski, T., & Pagano, P. J. (2003). Novel NAD(P)H oxidase inhibitor suppresses angioplasty-induced superoxide and neointimal hyperplasia of rat carotid artery. *Circulation Research*, 92(6), 637–643.
- Judkins, C. P., Diep, H., Broughton, B. R. S., Mast, A. E., Hooker, E. U., Miller, A. A., Selemidis, S., Dusting, G. J., Sobey, C. G., & Drummond, G. R. (2010). Direct evidence of a role for Nox2 in superoxide production, reduced nitric oxide bioavailability, and early atherosclerotic plaque formation in ApoE^{-/-} mice. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 298(1), H24–32.
- Lassègue, B., San Martín, A., & Griendling, K. K. (2012). Biochemistry, physiology, and pathophysiology of NADPH oxidases in the cardiovascular system. *Circulation Research*, 110(10), 1364–1390.
- Lengyel, L. (2010). *A TOJÁS ANTIOXIDÁNS KAPACITÁSÁNAK MÉRÉSE JAPÁNFÜRJEBEN*.
- Li, Hongli, & Sun, B. (2007). Toll-like receptor 4 in atherosclerosis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 11(1), 88–95.
- Li, Huige, & Förstermann, U. (2009). Prevention of atherosclerosis by interference with the vascular nitric oxide system. *Current Pharmaceutical Design*, 15(27), 3133–3145.
- Liu, J. Q., Zelko, I. N., Erbynn, E. M., Sham, J. S. K., & Folz, R. J. (2006). Hypoxic pulmonary hypertension: role of superoxide and NADPH oxidase (gp91phox). *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 290(1), L2–10.
- Majzinger, I. (2018). *APRÓVAD-ÁLLOMÁNYOK SZABÁLYOZÁSA ÉS HASZNOSÍTÁSA*.
- Matkovics, B., Szabó, L., Sz. Varga, I. (1988): Lipideroxidáció és a redukált glutation anyagcsere enzimek aktivitásának meghatározása biológiai mintákban. *Lab. Diagn.* 15:248–250.

- Mézes, M., & Matkovics, B. (1986). *A lipid peroxidáció molekuláris mechanizmusa és mennyiségi mérése*.
- Miller, Y. I. (2005). Toll-like receptors and atherosclerosis: oxidized LDL as an endogenous Toll-like receptor ligand. *Future Cardiology*, 1(6), 785–792.
- Moore, J. H., & Williams, D. L. (1968). The effect of diet on the composition and positional distribution of the fatty acids in the triglycerides obtained from the adipose tissues of rabbits. *The British journal of nutrition*, 22(3), 473–482.
- Nicholls, C., Li, H., & Liu, J.-P. (2012). GAPDH: a common enzyme with uncommon functions. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, 39(8), 674–679.
- Niki, E., Yoshida, Y., Saito, Y., & Noguchi, N. (2005). Lipid peroxidation: mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 338(1), 668–676.
- Nishimura, A., Ago, T., Kuroda, J., Arimura, K., Tachibana, M., Nakamura, K., Wakisaka, Y., Sadoshima, J., Iihara, K., & Kitazono, T. (2016). Detrimental role of pericyte Nox4 in the acute phase of brain ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 36(6), 1143–1154.
- Pachauri, S. P., Jacotot, B., & Beaumont, J. L. (1976). Circulating lipophages and aortic foam cells in experimental atherosclerosis of rabbits under altered reticuloendothelial activity. *Nutrition and Metabolism*, 20(1), 14–26.
- Paul Johnston, N., & Berrio, L. F. (1985). *Comparative effects of cottonseed, soybeans, safflower seeds and flax seeds on the performance of rabbits and guinea pigs*.
- Peluso, I., Morabito, G., Urban, L., Ioannone, F., & Serafini, M. (2012). Oxidative stress in atherosclerosis development: the central role of LDL and oxidative burst. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders Drug Targets*, 12(4), 351–360.
- Peter R., C. (1987). *Rabbit Feeding and Nutrition*. Academic Press, INC.
- Pietarinen-Runtti, P., Lakari, E., Raivio, K. O., & Kinnula, V. L. (2000). Expression of antioxidant enzymes in human inflammatory cells. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 278(1), C118-25.
- Placer, Z. A., Cushman, L. L., & Johnson, B. C. (1966). Estimation of product of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biochemical systems. *Analytical Biochemistry*, 16(2), 359–364.
- Raghunath, A., Nagarajan, R., Sundarraj, K., Panneerselvam, L., & Perumal, E. (2018). Genome-wide identification and analysis of Nrf2 binding sites - Antioxidant response elements in zebrafish. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 360, 236–248.
- Schröder, K., Zhang, M., Benkhoff, S., Mieth, A., Pliquet, R., Kosowski, J., Kruse, C., Luedike, P., Michaelis, U. R., Weissmann, N., Dimmeler, S., Shah, A. M., & Brandes, R. P. (2012). Nox4 is a protective reactive oxygen species generating vascular NADPH oxidase. *Circulation Research*, 110(9), 1217–1225.
- Schürmann, C., Rezende, F., Kruse, C., Yasar, Y., & Schröder, K. (2015). The NADPH oxidase Nox4 has anti-atherosclerotic functions. *European heart journal*, 36(48). <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehv460>
- Sedlak, J., & Lindsay, R. H. (1968). Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Analytical Biochemistry*, 25(1), 192–205.
- Sies, H., Berndt, C., & Jones, D. P. (2017). Oxidative Stress. *Annual Review of Biochemistry*, 86, 715–748.
- Sirokmány, G., Donkó, Á., & Geiszt, M. (2016). Nox/Duox Family of NADPH Oxidases: Lessons from Knockout Mouse Models. *Trends in Pharmacological Sciences*, 37(4), 318–327.
- Stefanson, A. L., & Bakovic, M. (2014). Dietary regulation of Keap1/Nrf2/ARE pathway: focus on plant-derived compounds and trace minerals. *Nutrients*, 6(9), 3777–3801.

- Szendrő, Z., Matics, Z., & Gerencsér, Z. (2011). *Húsnnyulak takarmányozása*. Kaposvári Egyetem.
- Vetési, F., Fekete, S., Papp, Z., Varga, I., & Zöldág, L. (1990). *Házinyúl-egészségtan* (V. Ferenc, Szerk.). Mezőgazdasági Kiadó.
- William, J. L., & M. Daniel, L. (2013). *Encyclopedia of Biological Chemistry*. Academic Press.
- Zana, M. (2019). *A Nox4 NADPH oxidáz működésének vizsgálata*. Semmelweis Egyetem, Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola.
- Zeeshan, H. M. A., Lee, G. H., Kim, H.-R., & Chae, H.-J. (2016). Endoplasmic Reticulum Stress and Associated ROS. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(3), 327.
- Zhang, B., Xu, J., Li, C., Shi, S., Ji, S., Xu, W., Liu, J., Jin, K., Liang, D., Liang, C., Liu, L., Liu, C., Qin, Y., & Yu, X. (2016). MBD1 is an Epigenetic Regulator of KEAP1 in Pancreatic Cancer. *Current Molecular Medicine*, 16(4), 404–411.
- Zhang, M., Brewer, A. C., Schröder, K., Santos, C. X. C., Grieve, D. J., Wang, M., Anilkumar, N., Yu, B., Dong, X., Walker, S. J., Brandes, R. P., & Shah, A. M. (2010). NADPH oxidase-4 mediates protection against chronic load-induced stress in mouse hearts by enhancing angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(42), 18121–18126.
- Zhang, S., Duan, S., Xie, Z., Bao, W., Xu, B., Yang, W., & Zhou, L. (2022). Epigenetic Therapeutics Targeting NRF2/KEAP1 Signaling in Cancer Oxidative Stress. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 924817.

NYILATKOZAT

a záródolgozat/szakdolgozat/diplomadolgozat/portfólió¹ nyilvános hozzáféréseiről és eredetiségéről

A hallgató neve: Major Fanni Gilla
A Hallgató Neptun kódja: HLH31
A dolgozat címe: az oxidatív és antioxidatív rendszerek vizsgálata genetikailag módosított nyúl
A megjelenés éve: 2023 modellben kórokozók elleni védekezés
A konzulens intézetének neve: Élettani és Takarmánygazdálkodási Intézet
A konzulens tanszékének a neve: Takarmányfiziológiai Tanszék

Kijelentem, hogy az általam benyújtott záródolgozat/szakdolgozat/diplomadolgozat/portfólió² egyéni, eredeti jellegű, saját szellemi alkotásom. Azon részeket, melyeket más szerzők munkájából vettem át, egyértelműen megjelöltem, és az irodalomjegyzékben szerepeltettem.

Ha a fenti nyilatkozattal valótlan állítottnak tartom, tudomásul veszem, hogy a záróvizsga-bizottság a záróvizsgából kizár és a záróvizsgát csak új dolgozat készítése után tehetek.

A leadott dolgozat, mely PDF dokumentum, szerkesztését nem, megtekintését és nyomtatását engedélyezem.

Tudomásul veszem, hogy az általam készített dolgozatra, mint szellemi alkotás felhasználására, hasznosítására a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem mindenkori szellemi tulajdon-kezelési szabályzatában megfogalmazottak érvényesek.

Tudomásul veszem, hogy dolgozatom elektronikus változata feltöltésre kerül a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem könyvtári repozitori rendszerébe. Tudomásul veszem, hogy a megvédett és

- nem titkosított dolgozat a védelmet követően
- titkosításra engedélyezett dolgozat a benyújtásától számított 5 év eltelté után nyilvánosan elérhető és kereshető lesz az Egyetem könyvtári repozitori rendszerében.

Kelt: Budapest, 2023. év 11. hó 08. nap

Major Fanni Gilla
Hallgató aláírása

¹ A megfelelő dolgozattípus meghagyása mellett a többi típus törlendő.

² A megfelelő dolgozattípus meghagyása mellett a többi típus törlendő.

NYILATKOZAT

Ungor Fanni (név) (hallgató Neptun azonosítója: HLH31)
konzulenseként nyilatkozom arról, hogy a
záródolgozatot/szakdolgozatot/diplomadolgozatot/portfóliót¹ áttekintettem, a hallgatót az
irodalmi források korrekt kezelésének követelményeiről, jogi és etikai szabályairól
tájékoztattam.

A záródolgozatot/szakdolgozatot/diplomadolgozatot/portfóliót a záróvizsgán történő
védésre javaslom / nem javaslom².

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem³

Kelt: Győrffy év 2023. 11. hó 06. nap

Béla
belső konzulens

¹ A megfelelő dolgozattípus meghagyása mellett a többi típus törlendő.

² A megfelelő aláhúzendő.

³ A megfelelő aláhúzendő.