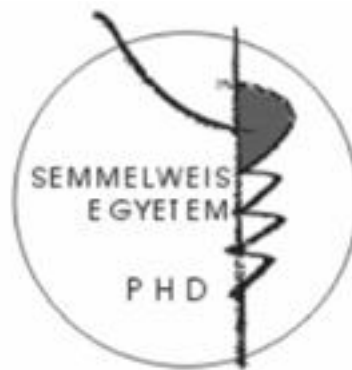


Kis molekulatömegű szerves vízi szennyezőanyagok hatása a sejtadhézióra és migrációra

Doktori tézisek

Láng Júlia Anna

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Kőhidai László egyetemi docens, az orvostudományok
kandidátusa

Hivatalos bírálók: Dr. Dobay Orsolya, egyetemi adjunktus, Ph.D.
Dr. Kapui Zoltán, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Tóth Miklós egyetemi tanár, MTA doktora
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Csukás Zsuzsanna egyetemi docens, Ph.D.
Dr. Sveiczter Ákos egyetemi docens, Ph.D.

Budapest
2013

Bevezetés

A sejtmigráció alapvető jelentőségű folyamat, amely mind az egysejtű, mind a soksejtű organizmusok életműködésében kulcsfontosságú szerepet tölt be. Az egysejtű élőlények mozgását környezetük számos fizikai-kémiai tényezője modulálhatja. A soksejtű szervezetek sejteinek helyváltoztatása szintén az *in vivo* kémiai és fizikai stimulusok által bonyolult módon szabályozott, komplex folyamat.

A sejtek mozgását befolyásolni képes kémiai komponensek rendkívüli változatossága - a szerkezet vagy a fizikai-kémiai tulajdonságok terén egyaránt - felvetette annak lehetőségét, hogy a környezetben viszonylag alacsony koncentrációban előforduló környezeti szennyezőanyagok szintén képesek lehetnek a sejtmigráció befolyásolására. E lehetőséget, valamint a migrációs válasz kiemelkedő érzékenységét több, különböző szennyezőanyagokkal (pl. nehézfémekkel, poliaromás szénhidrogénekkal) végzett, elsősorban bioremediációs célú kísérlet is igazolta.

Az antropogén - főképp vízi - szennyezőanyagok viszonylag új, ám igen jelentős csoportját jelentik a humán és állatgyógyászatban nagy mennyiségben alkalmazott gyógyszerek, valamint a kozmetikai termékekben jelenlevő kémiai adalékok (pl. illatanyagok). E „feltörekvő szennyezőknek” („emerging contaminants”) is mondott komponensekre jellemző, hogy i) a környezetben igen alacsony koncentrációban ($<10^{-8}$ M) vannak jelen; ii) egyelőre nem standardizáltak a kémiai meghatározásukra, valamint a biológiai aktivitásuk mérésére irányuló módszerek; iii) nincsen egységes jogi szabályozás (pl. az Európai Unióban) a megengedett környezeti előfordulásukra vonatkozóan. A vízi környezetben leggyakrabban előforduló hatóanyagcsaládok a nemszteroid alapuló gyulladáscsökkentők (NSAID), az antibiotikumok, továbbá - egyebek mellett - a β -adrenerg antagonisták és a jódózott kontrasztanyagok.

A gyógyszerhatóanyagok rendeltetésüknél fogva biológiailag aktív szerek, amelyek a környezetbe kerülve a molekuláris célpontjukhoz hasonló biomolekulákat (pl. receptor) tartalmazó, egyébként nem célorganizmusokra is hathatnak. Ez teszi szükségessé biológiai aktivitásuk mérését, amely más tekintetben (pl. biológiai hozzáférhetőség szempontjából) is kiegészítő információval szolgál a műszeres analitikai mérésekhez képest. Bár az irodalom a molekuláris szerveződési szinttől egészen a modell-ökoszisztémákig számtalan különböző ökotoxicitási teszt típusról számol be, továbbra is limitált azon assay-k köre, amelyek a fenti szennyezőanyagok rendkívül alacsony (ng/l-

$\mu\text{g/l}$) környezeti koncentrációinak érzékelésére képesek. Ilyen ígéretes módszerek lehetnek a viselkedési assay-k, így az ezek speciális formáját jelentő migrációs válaszokat mérő technikák is, amelyeknek érzékenysége az irodalmi adatok alapján 1-2 nagyságrenddel jobb, mint a klasszikus (pl. proliferáció, letalítás) végpontoké. A latapadás-függő modell-sejtek esetében a migrációban és az annak bevezetőlépéseként létrejövő sejtadhézióban rejlő lehetőség kiaknázására például az impedancia alapú technikák jelentenek ígéretes megoldást. E technikák közös elvi alapja az intakt sejtek elektromos szigetelő tulajdonsága, amelynek révén - elektromos térben - a sejtek elektród felszínre történő kitapadását ellenállás növekedés kíséri. A sejtek toxikus hatásra bekövetkező adhézió/viabilitás csökkenése pedig ellenállás csökkenés formájában nyilvánul meg, amelyet valós időben követhetünk. Ebből adódóan e módszerek, akár a vízminőség on-line, a mintavétel helyszínén történő monitorozására is alkalmasak lehetnek.

A fentieket figyelembe véve, munkánk célja a legjelentősebb hatóanyagcsoportok sejtviabilitásra/proliferációra, valamint sejtadhézióra/migrációra kifejtett hatásainak vizsgálata volt a filogenezis különböző szintjeit képviselő modell-sejteken. Emellett célul tűztük ki két az ökotoxikológia területén eddig nem használt, migrációmérésen alapuló technika alkalmazhatóságának vizsgálatát is. Egyfelől optimalizáltuk a fent említett impedancia alapú migrációmérések egy változatát (az „electric fence” módszert); másfelől a nemrég leírt, a sejtek környezetének rigiditás gradiense által irányított mozgásforma az ún. durotaxis mérésének alkalmazhatóságát is vizsgáltuk.

Célkitűzések

Munkám első szakaszában kísérleteimet a *Tetrahymena pyriformis* GL édesvízi eukarióta csillós egysejtűn végeztem. Első lépésben a kozmetikai- és élelmiszeriparban illatanyagként alkalmazott, kis szerkezeti eltéréseket mutató komponensek segítségével vizsgáltam a kemotaxis molekula-specifitását, valamint a kemotaktikus válasz háttérében álló szignalizációs folyamatokat. Vizsgálataimban az alábbi kérdésekre kerestem választ:

- ***Különböznek-e a hasonló szerkezetű (konstitúciós izomer) molekulák által kiváltott kemotaktikus válaszok?***
- ***Van-e hasonlóság egy adott anyag és a szintézise során alkalmazott reagensek - mint az anyagokban esetlegesen felfedezhető maradék molekulák -, kemotaktikus profilja között?***

- ***Részt vesz-e a kemotaktikus szignalizáció két csomóponti komponense, a foszfolipáz-C és a foszfatidil-inzitol-3-kináz az anyagok által kiváltott attraktáns válaszok mediálásában?***

Ezt követően 14, a humán- és állatgyógyászatban nagy tömegben felhasznált, következőképpen a vízi környezetben gyakran előforduló gyógyszerhatóanyag sejtbiológiai hatásait vizsgáltam. A tanulmányozott hatóanyagcsaládok a nemszteroid gyulladáscsökkentők, az antibiotikumok, a β -adrenerg antagonisták és a jódozott kontrasztanyagok voltak. Kísérleteim az alábbi kérdések megválaszolására irányultak:

- ***Gátolják-e a hatóanyagok a *T. pyriformis* proliferációját és kemotaxisát a környezeti szempontból releváns koncentráció tartományokban ($<10^{-8}M$)?***
- ***Prediktálható-e a gyógyszerhatóanyag keverékek proliferáció gátló hatása a más tesztorganizmusokon validált koncentráció addíciós modellel?***

A csillós egysejtűvel végzett munkám lezárásaként a fenti kísérletek során kidolgozott, újonnan bevezetett, proliferáció gátlás és kemotaxismérésekből álló tesztrendszert a gyakorlatban alkalmaztam. Ekkor a diklofenák nagy hatékonyságú oxidációs bontása során keletkező bomlástermék-keverékek biológiai aktivitását vizsgáltam. Feltett kérdéseim az alábbiak voltak:

- ***A diklofenák vákuum-UV (VUV) fotolízise során a besugárzási idő előrehaladtával hogyan változik a keletkező termékelegy biológiai aktivitása?***
- ***Van-e különbség az oxigéntelített és az oxigén kizárásával végzett bontásból nyert minták biológiai aktivitása között?***

Munkám második szakaszában vizsgálataimat 3 humán sejtvonalon végeztem (HaCaT spontán transzformálódott keratinocita, HepG2 hepatocelluláris karcinóma és MCF7 emlőkarcinóma sejtvonalak), amik a toxikológiában más-más szervek/funkciók specifikus és validált modelljének számítanak. A fent említett környezeti szennyező hatóanyagok sejtvitalitására gyakorolt hatását kutató kísérleteim célja az alábbi kérdések megválaszolása volt:

- ***Hogyan hat a 14 gyógyszermolekula a sejtek viabilitására? Függ-e a citotoxicitási assay érzékenysége az alkalmazott sejtvonaltól és expozíciós időtől?***
- ***A mitokondriális dehidrogenáz aktivitáson alapuló (MTT) assay-ben leghatásosabbnak talált anyagok impedimetriai módszerrel mért toxicitása hogyan korrelál az MTT módszerrel kapott eredményekkel?***

Ezután a citotoxicitási assay-ben leghatásosabbnak talált két molekulacsalád, a nemszteroid alapú gyulladáscsökkentők és a β -blokkolók szelektált tagjainak sejtmigrációra kifejtett hatását vizsgáltam. Ennek során foglalkoztam az ökotoxikológiában új, két innovatív technika alkalmazhatóságának kérdésével is. Az első, a korábban ezen a területen nem alkalmazott, valós idejű mérést lehetővé tevő impedimetria alapú „electric fence”

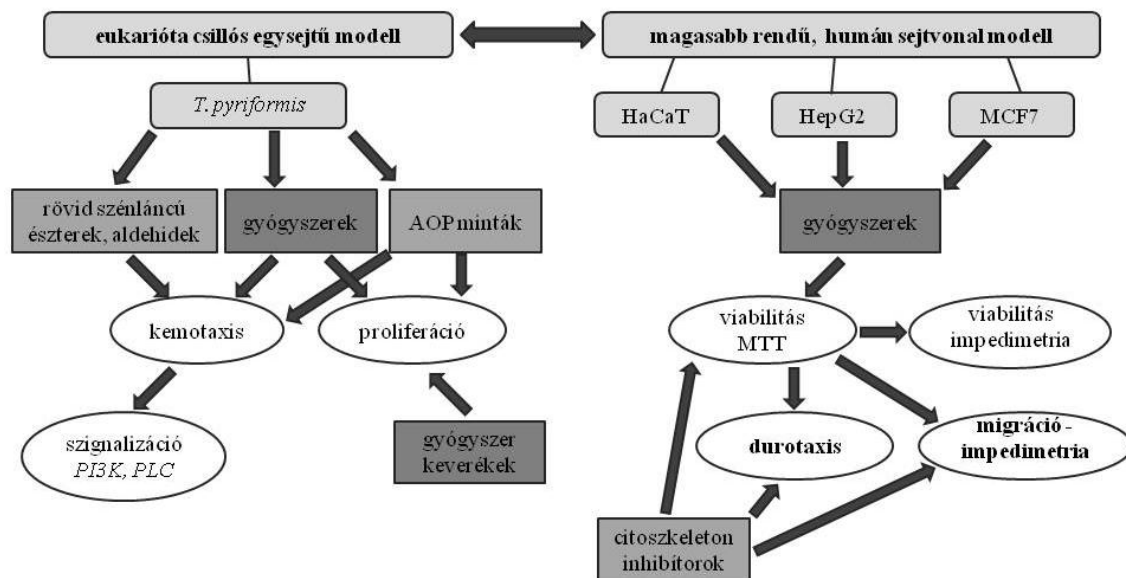
(„elektromos kerítés”) migrációs assay, amelyet az alábbi kérdések megválaszolása kapcsán használtunk:

- **Alkalmos modell-e az impedimetriás migrációs assay-kben a 3 vizsgált sejtvonal?**
- **Befolyásolja-e az MTT módszerrel leghatásosabbnak talált 3 gyógyszermolekula a sejtek migrációját a környezeti szempontból releváns koncentrációban alkalmazva?**

Emellett a Cambridge-i Egyetem Cavendish Laboratóriumában tett tanulmányutam során végzett kísérleteinkben az ökotoxikológia területén szintén új durotaxis assay segítségével elsőként vizsgáltuk annak a lehetőségét, hogy a környezeti szennyező anyagok befolyásolhatják a sejtek durotaxisát. Kísérleteink az alábbi kérdések megválaszolására irányultak:

- **Megfigyelhető-e az általam alkalmazott sejtvonalak durotaxisa az erre a célra kialakított, rigiditás lépcsőket tartalmazó hidrogél felszíneken?**
- **Hogyan hatnak a citoskeletonot gátló szerek a durotaxisra és a durotaxis inhibíció során változik-e a sejtek adhéziós/migrációs képessége?**
- **Képesek-e a kiválasztott gyulladáscsökkentők és β -blokkolók a HaCaT és a durotaxis vizsgálatokban referenciának tekintett 3T3 (egér fibroblaszt) sejtek durotaxisát gátolni?**

Az értekezésemben tárgyalt legfőbb vizsgálatokat a 1. ábra foglalja össze.



1. ábra: A kutatómunkám alapjául szolgáló modell-organizmusok és vizsgálati módszerek

Módszerek

Vizsgált anyagok

Az élelmiszer- és kozmetikai ipar által íz- és illatanyagként használt 7 észter szintézisét és kémiai karakterizálását az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoportja végezte.

Az általunk vizsgált további 4 ízanyag aromás aldehidet, a 14 gyakori vízi szennyező gyógyszerhatóanyagot, valamint a durotaxis kísérletekben alkalmazott citoskeletális elemeket gátló szereket a Sigma-Aldrich Kft-től vásároltuk.

A diklofenák vákuum-UV fotolízisét és az ebből származó minták kémiai analízisét a Szegedi Tudomány Egyetem Műszaki és Anyagtudományi Intézetében, ill. a Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék Környezetkémiai Kutatócsoportjában végezték.

Modell-sejtek

Munkám első szakaszában kísérleteimet a *Tetrahymena pyriformis* GL nempatogén édesvízi csillós egysejtűn végeztem. E modell választását a gyakorlati előnyei (pl. 150 perces, viszonylag rövid generációs ideje) mellett a magasabb rendűek sejtjeivel mutatott jelentős homológiája (pl. receptorok) és ökológiai jelentősége indokolta.

Munkám második szakaszában vizsgálataimat 3 humán sejtvonalon folytattam, amelyek más-más szerv/funkció specifikus és validált modelljének számítanak a toxikológiában. Az alkalmazott sejtvonalak i) a HaCaT spontán transzformálódott keratinocita, ii) a HepG2 hepatocelluláris karcinóma és iii) az MCF7 emlőkarcinóma sejtvonala volt. Ezek mellett a durotaxis vizsgálatainkban a 3T3 egér fibroblaszt sejtvonalat, mint referenciát alkalmaztuk.

***Tetrahymena pyriformis* proliferáció gátlás vizsgálat**

A környezeti szennyező gyógyszerhatóanyagok, ill. a diklofenák fotolízisből származó minták toxikus hatását 24 órás expozíciós időt követően, a sejtszám meghatározásával mértük. A sejtszámot a CASY TT (Innovatis-Roche) impedancia alapú sejtszámláló készülék segítségével határoztuk meg.

Kemotaximérés

A csillós egysejtű kemotaktikus válaszána mérésére a kapilláris kemotaxis assay Munkacsoportunk által módosított változatát használtuk. Ezen elrendezésben a belső, testoldatot tartalmazó kamrát egy 8 csatornás pipetta steril hegyei jelentették. A külső, sejtsuszpenziót tartalmazó kamrát pedig egy 96 lyukú steril tenyésztő lemez kamrái adták. Az assay inkubációs ideje 20 perc volt.

***T. pyriformis* jelátviteli útvonalainak vizsgálata**

A kemotaxis szignalizációjában jelentős szerepet játszó két enzim, a foszfolipáz-C (PLC) és a foszfatidil-inzitol-3-kináz (PI3K) esetleges aktivációját kemoattraktáns észterekkel való stimulációt alkalmazva tanulmányoztuk. A PLC aktivációját immuncitokémiával áramlási citométerben (FACS-Calibur, Beckton-Dickinson) mértük, míg a PI3K szerepét indirekt módon, két specifikus gátlószer (wortmannin, LY29004) adásával vizsgáltuk.

Sejtvonalak kolorimetriás viabilitásmérése

A gyógyszerhatóanyagok, ill. a citoskeletális gátlószer sejtvonalakra gyakorolt toxikus hatását a mitokondriális dehidrogenáz enzim redukáló aktivitásán alapuló MTT (3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolium bromid) módszerrel, ill. a reszazurin kék redukcióján alapuló AlamarBlue módszerrel mértük.

Impedancia alapú viabilitás- és migrációmérés

A különböző impedancia alapú készülékek működésének közös elvi alapja, hogy váltóáramú térben a sejtek elektródfelületre történő kitapadása valós időben impedancia növekedés formájában mérhető. A gyógyszerhatóanyagok viabilitásra kifejtett hatását az xCELLigence SP (Roche) rendszerben mértük, míg a sejtmigrációt befolyásoló hatásukat az ECIS 1600 és ECIS Z Θ (Applied BioPhysics) készülékekben követtük. A 2 készülékben megvalósított sebgyógyulási assay és „electric fence” módszer közötti lényeges különbség, hogy az előbbinél az elektród felszínén kialakult már konfluens sejtrétegben hozunk létre elektromos impulzus segítségével folytonossághiányt és e sebösszezáródását követjük nyomon. Ezzel szemben az „electric fence” („elektromos kerítés”) módszernél a sejteket nem engedjük az elektród felszínén nőni, csak körülötte, és a mérőelektródra történő bevándorlást a „fence” kikapcsolását követően mérjük.

Durotaxis assay

A mozgási felszín rigiditás gradiense által kiváltott irányított sejtmozgást (durotaxist) a Cambridge-i Egyetem Cavendish Laboratóriumában kidolgozott technika segítségével vizsgáltuk. Ehhez topográfiaileg megmunkált üveglemezek felszínén polimerizáltattunk poliakrilamid hidrogélt, amelyekben a kialakuló változó rétegvastagságú területekre eltérő látszólagos rigiditás volt jellemző. A géltre kiültetett, gyógyszerekkel vagy

citoszkeletális inhibitorokkal előkezelt sejtek rigiditás-függő eloszlását 24 óra múlva mikroszkóposan (Zeiss LSM-510) értékeltük ki.

Statisztikai kiértékelés

A mérési eredmények statisztikai kiértékelését *OriginPro8*[®] szoftverrel végeztük. Az eredmények negatív kontrollhoz viszonyított eltérésének szignifikanciáját egyutas ANOVA módszerrel értékeltük ki. A koncentráció-hatás görbék illesztését szintén az említett szoftverben a 4 paraméteres logisztikus egyenlet alapján végeztük.

Eredmények

Csillós egysejtű modell

1. Munkánk kezdeti lépéseként a kis szerkezeti eltéréseket mutató illatanyagok (7 észter és 4 aromás aldehid) vizsgálatával elsősorban a hasonló szerkezetű molekulák által kiváltott migrációs válaszok azonos, vagy eltérő voltát kívántuk elemezni. Emellett szintén tanulmányoztuk az illatanyagok szintéziséhez használt, esetleges szennyezőként jelen levő reagensek (3 sav és 2 alkohol) és maguk az észterek által kiváltott válaszok esetleges átfedéseit.

Eredményeink alátámasztották a *T. pyriformis* kemotaxisának csekély molekulaszerkezeti eltérésekkel szembeni érzékenységét. Hiszen jóllehet mind a $C_5H_{10}O_2$, mind a $C_7H_{14}O_2$ összegképletű izomerek között találtunk hasonlóságokat (pl. izoamil-acetát és izobutil-propionát attraktáns jellege 10^{-9} és 10^{-6} M koncentrációban, vagy a metil-butirát és a metil-izobutil-attraktáns karaktere 10^{-9} M koncentrációban), azért az izomerek kemotaktikus profiljai között számottevő különbségek is előfordultak (pl. izobutil-propionát repellens hatása 10^{-12} M-ban szemben az izoamil-acetát attraktáns természetével). Ezen eredmények összhangban vannak Munkacsoportunk korábbi megállapításaival, amelyek a 20 fehérjealkotó L-aminosav által kiváltott molekulaspecifikus kemotaktikus válaszokról számoltak be.

Az illatanyagok és az előállításuk során felhasznált reagensek kemotaktikus profiljának összevetése az izomerekről elmondottakhoz hasonlóan azt mutatta, hogy a legtöbb észter esetében 1-1 csúcsban tapasztaltunk hasonlóságot a megfelelő savval, vagy alkohollal, azonban minden esetben különbségek is megfigyelhetők voltak a kiváltott kemotaktikus válaszokban. Ez arra utal, hogy az illatanyagok előállítása során esetleges

nyomnyi mennyiségben jelenlevő reagens eredetű szennyeződések az észterek kemotaktikus hatását nem befolyásolják számottevően.

2. Előbbi kísérleteink folytatásaként a kemotaxis szignalizációjában kulcsszerepet játszó két enzim a foszfolipáz-C (PLC) és foszfatidil-inozitol-3-kináz (PI3K) kemoattraktáns észterrel történő stimulációra bekövetkező aktivációját vizsgáltuk. Jóllehet a csillós egysejtűek kemotaxisa és a magasabb rendűek szaglójában kialakuló jelátviteli folyamatok a résztvevő komponensek tekintetében számos ponton nagyfokú egyezést mutatnak, a fenti két enzim szaglásban betöltött szerepével kapcsolatban az irodalomban ellentmondásos adatokat találunk.

Eredményeink alapján a kemoattraktáns észterek általi stimuláció nem váltotta ki a PLC jelentős aktivációját, illetve a kiváltott kemoattraktáns válasz nem függött a PI3K enzim aktivitásától. Ez alapján tehát az illatanyag észterek szignalizációja elsődlegesen nem a foszfatidil-inozitol másodlagos hírvivők közvetítésével történik, hanem egyéb mediátorokon, pl. a c-AMP-n keresztül. Erre utalnak az irodalomban azon eredmények is, amelyek a gyümölcsészterek (pl. izoamil-acetát) szaglójában megvalósuló, c-AMP mediálta szignalizációjáról számolnak be.

3. Munkánk következő szakaszában a leggyakoribb vízi szennyező gyógyszerek közül 14 molekula sejtleletani hatásait vizsgáltuk két sejtfiziológiai válaszra, a klasszikusnak számító proliferációra és a ritkábban vizsgált kemotaxisra fókuszálva. Jóllehet az említett molekulák növekedésre, szaporodásra gyakorolt hatásáról több általánosan elterjedt modell-organizmus (pl. vízi bolha (*Daphnia magna*), esetében vannak irodalmi adatok, a protozoon trófikus szint képviselőivel, valamint a mozgási viselkedésen alapuló módszerekkel kapcsolatban hiányos az irodalom. A *T. pyriformis* protozoon vizsgálata azért is kiemelkedő jelentőségű, mivel az a kvantitatív szerkezet-hatás összefüggések (QSAR) felállításához általánosan használt organizmus. Ezen QSAR összefüggések pedig, a kísérletes toxicitási adatok hiányában, igen fontosak a környezetszennyező gyógyszerhatóanyagok ökológiai kockázatának becslése során.

Eredményeink alapján elmondható, hogy a 14 gyakori vízi szennyező hatóanyag akut proliferáció gátló hatása a Tetrahymenára a vízi környezetben nem valószínű, hiszen az acetyl-szalicilsav kivételével egyik molekula sem okozott szignifikáns proliferáció csökkenést a környezeti szempontból releváns koncentráció tartományban (1. Táblázat).

Az eritromicin által kiváltott, 10^{-10} - 10^{-8} M koncentrációban megfigyelt enyhe proliferáció fokozó hatás ökotoxikológiai szempontból feltételezhetően nem releváns.

Ugyanakkor a kemotaxis mérés eredményei igazolták, hogy a 14 hatóanyagból 13 képes szubletális, mozgási viselkedést befolyásoló hatást kiváltani a környezeti szempontból releváns koncentrációtartományban (az 1. táblázatban félkövér betűvel szedve), ami alátámasztja a migrációs assay-k kiemelkedő érzékenységéről korábban elmondottakat.

1. táblázat. A vizsgált hatóanyagok toxikus és kemotaktikus hatásának összehasonlítása

		Proliferáció		Kemotaxis	
		Hatás	C (M)	Hatás	C (M)
NSAID	acetil-szalicilsav	-	10^{-11} - 10^{-8}	-	10^{-15} , 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-6}
	diklofenák	-	$\geq 10^{-4}$	-	10^{-15} , 10^{-14} , 10^{-12} - 10^{-9}
	fenoprofén	-	$\geq 10^{-4}$	-	10^{-14}
	ibuprofén	-	$\geq 10^{-3}$	-	10^{-7}
	naproxén	-	10^{-3}	+	10^{-13} , 10^{-12}
Fájdalomcsillapító	paracetamol	+	10^{-3}	-	10^{-14} , 10^{-12} , 10^{-11}
Antibiotikum	eritromicin	+	10^{-10} - 10^{-8}	+	10^{-9}
				-	10^{-15}
	linkomicin	0		+	10^{-15} , 10^{-9} , 10^{-7}
				-	10^{-12} , 10^{-6}
	szulfametoxazol	-	$\geq 10^{-3}$	+	10^{-12} , 10^{-11} , 10^{-9} , 10^{-6}
trimetoprim	-	$\geq 10^{-7}$	+	10^{-14} , 10^{-7}	
β -blokkoló	metoprolol	-	$\geq 10^{-5}$	-	10^{-15} , 10^{-14} , 10^{-7} 10^{-6}
	propranolol	-	$\geq 10^{-6}$	-	10^{-15} , 10^{-11} - 10^{-10}
	timolol	-	$\geq 10^{-5}$	+	10^{-6}
-				10^{-15} , 10^{-14}	
Kontrasztanyag	Na-diatrizoát	0		+	10^{-14} , 10^{-7} , 10^{-6}
				-	10^{-8}

Ugyanakkor, e kiemelkedő érzékenység ellenére is, a koncentráció-kemotaktikus válasz görbék nem monoton, több csúcsot tartalmazó jellegéből adódóan a kemotaxismérés inkább kvalitatív, mint kvantitatív módszerként lehet hasznos az ökotoxikológia területén. A koncentráció-válasz görbék e nem monoton lefutása egyébként a hormézissel magyarázható, amely általános jelenség a toxikológia területén: a filogenezis különböző szintjein álló számtalan modell és assay végpont esetében leírták. Bár a kialakításában résztvevő pontos sejtszintű mechanizmusok egyelőre nem teljesen ismertek, oka valószínűleg az adott molekula kötésére képes, de eltérő ligand affinitást mutató

receptor populációk jelenlétében keresendő. Emellett az irodalom szerint a kemotaxis kialakításában résztvevő receptorok telítettségének szintén szerepe lehet a nem monoton koncentráció-válasz görbék létrejöttében, mivel a kevésbé vagy túltelített receptorok csökkent kemotaktikus választ eredményezhetnek.

4. Mivel a környezeti szennyező gyógyszerhatóanyagok a vizekben nem egyedül, hanem egy komplex keverék tagjaiként vannak jelen, munkánk következő szakaszában a legtoxikusabbnak talált két molekulacsalád, a nemszteroid gyulladáscsökkentők és a β -blokkolók két-két legtoxikusabb, vízoldható tagjából (a diklofenákból és ibuprofénből; a metoprololból és a propranololból) alakítottunk ki kétkomponensű keverékeket. Kísérleteink elsődleges célja az egyéni koncentráció – proliferáció gátlás görbékből számított értékek összegzéséből számított és a mért keveréktoxicitás összevetése volt. Ezáltal az ökotoxikológiában általánosan elfogadott koncentráció addíciós modell helytállóságát kívántuk vizsgálni a *T. pyriformis*-on.

A 6 vizsgált hatóanyagpár, összesen 96 eltérő összetételű keverékénél tapasztalt eredményeink alapján elmondható, hogy a molekulapárok tagjai az esetek kb. 1/3-ában hatottak együtt additívan. Az keverékek fennmaradó 2/3-ában szinte mindenhol antagonizmust tapasztaltunk, amelynek előfordulási gyakorisága a keverékek összkoncentrációjának növekedésével párhuzamosan nőtt. Emellett lényegesen magasabb volt az antagonizmus gyakorisága az azonos molekuláris célpontokra ható molekulák keverékeiben. Ezzel szemben az eltérő molekuláris célponton ható diklofenák és metoprolol keverékeiben a 16 esetből 7-szer szinergizmust tapasztaltunk. Mindezek alapján tehát megállítható, hogy a más modelleken (pl. vízibolha, alga) a hasonló gyógyszerek együttes hatásait kielégítő megbízhatósággal prediktáló koncentráció addíciós modell a *T. pyriformis* esetében nem alkalmazható általános érvénnyel. Ugyanakkor, a hatóanyagpárokban megfigyelt additív, sőt szinergista kölcsönhatások jelzik, hogy az önmagukban hatástalan koncentrációban jelenlévő komponensek keverékei kiválthatnak számottevő biológiai hatást, amelyet ezen anyagok környezeti kockázat elemzése során figyelembe kell venni.

5. A csillós modellel folytatott kísérleteink lezárásaként a proliferáció gátlás és kemotaxismérésből álló tesztrendszerrel egy gyakorlati probléma megoldására, nevezetesen a diklofenák vákuum-UV fotolízisének nyomonkövetésére, valamint a

folyamat optimális működési paramétereinek (kezelési idő; O₂-telített vs. O₂-mentes környezet) meghatározására használtuk.

Eredményeink alapján megerősítést nyert az említett két bioassay kombinált alkalmazásának létjogosultsága, hiszen mindkét módszerrel különbséget tapasztaltunk mind az különböző kezelési idők után vett, mind az eltérő bontási körülményekből származó minták biológiai aktivitása között. Emellett a proliferáció gátlás assay eredményei a kémiai analízis eredményeivel is összefüggésbe hozhatónak bizonyultak. A kezeletlen minták enyhe (kb. 13%-os) proliferáció gátló hatása ugyanis az O₂-telített környezetből származó minták esetében a 10 s - 900 s kezelést követően kissé fokozódott (kb. 25%-ig), míg az O₂-mentes mintáké ezen időintervallumban 0 %-ra csökkent. Ez valószínűleg az O₂-telített környezetben jóval nagyobb mennyiségben keletkező 5-hidroxi-diklofenák aromás köztitermék jelenlétével magyarázható. A 2400 s – 3600 s kezelést követően vett mintáknál a két körülmény esetében megfigyelhető eltérő toxicitás profil háttérében a különböző mértékű mineralizáció (azaz a szerves bomlástermékek egyszerűbb szervetlen vegyületekké alakulása) állhat. Az O₂-telített környezetből vett minták toxikus hatása ugyanis a kezelési idő növelésével 30 %-ról gyakorlatilag 0 %-ra csökkent, ugyanakkor az O₂-mentes környezetből származó minták toxicitása 20 % körül stagnált. Ennek oka valószínűleg az O₂-telített mintáknál megfigyelhető kb. 70 %-os mineralizációs lehet, szemben az O₂-menteseknél tapasztalt lényegesen alacsonyabb 20-25 %-kal.

A kemotaxis vizsgálatok eredményei a fentieket kiegészítve azt mutatták, hogy a toxikus hatással nem rendelkező 3600 s bontási idő után vett O₂-telített minták is rendelkeztek migrációt befolyásoló hatással. Emellett az is kiderült, hogy a fotolízis során keletkező bomlástermékek a diklofenák kemorepellens jellegét megőrizték, bár a kapott kemotaktikus válaszok pontosabb értelmezéséhez a keletkező bomlástermékek egyéni vizsgálata mindenképpen szükséges.

6. Munkánk második felében kísérleteimet 3, a toxikológiában bevett modellnek számító humán sejtvonalon folytattam. Első lépésként a klasszikusnak számító mitokondriális dehidrogenáz aktivitáson alapuló MTT módszert alkalmaztam a 14 vízi szennyező gyógyszerhatóanyag sejtvitalitásra gyakorolt hatásának vizsgálatára. Ezután a legtoxikusabbank talált 3 hatóanyag toxikus hatását impedimetria módszerrel valós időben is követtem, mivel korábbi irodalmi eredmények alapján e technika a citotoxikus

hatások érzékeny detektálását teszi lehetővé, valamint a toxicitás kinetikájáról, reverzibilis/irreverzibilis voltáról is értékes információkkal szolgál.

A 3 sejtvonalon a klasszikus MTT módszert alkalmazva, azt tapasztaltuk, hogy a humán sejtvonalak általában kevésbé érzékenyek voltak a gyógyszerhatóanyagra, mint a csillós modell. Ez valószínűleg a szorosan egymáshoz simuló, letapadó sejtek kisebb fajlagos expozíciós felületével magyarázható. A sejtvonalak érzékenysége egyedül az antibiotikum eritromicin és a fájdalomcsillapító paracetamol esetében haladta meg a csillós modellét. Emellett két nemszteroid gyulladáscsökkentőnél (diklofenák és fenoprofén) az egysejtű modell érzékenysége közel azonos volt a HepG2 sejtvonalával. Szintén a *T. pyriformis*-on kapott eredményekhez hasonlóan, mindegyik sejtvonalon a propranolol bizonyult a legtoxikusabbnak. A propranololnak e kiemelkedő toxicitását az irodalom az erős membránstabilizáló hatásának tulajdonítja. A sejtvonalakon mért EC_{50} értékek legtöbbször az assay expozíciós idejétől (24 h, 48 h, 72 h) függetlenek voltak arra utalhat, hogy az anyagok gyorsan metabolizálódnak a sejtekben, ahol inaktív termékek keletkeznek belőlük. Ez alól a diklofenák (HaCaT) és a fenoprofén (MCF7) jelentett kivételt, amelyeknél az 72 h-nál mért EC_{50} érték a 24 h-ás érték fele volt. Ez utalhat arra, hogy ezen anyagokból a sejtekben fokozottan aktív metabolitok keletkeznek.

A valós idejű impedimetriás viabilitásmérés és az MTT módszer eredményei jó egyezést mutattak az anyagok toxicitási sorrendjében (propranolol > diklofenák > metoprolol). Ugyanakkor az irodalmi adatokkal egyezően, az előbbi módszerrel mért EC_{50} értékek kb. 1,5 - 2-szer alacsonyabbak voltak. A környezeti szempontból releváns koncentrációban (10^{-12} – 10^{-8} M) alkalmazva azonban a hatóanyagok a sejtadhéziót nem befolyásolták szignifikánsan.

7. Mivel a csillós egysejtű modell esetében a kemotaxis a proliferációnál lényegesen érzékenyebb sejtelettani válasznak bizonyult és a gyógyszerek túlnyomó többsége még a környezeti szempontból releváns koncentrációtartományban is képes volt szignifikáns kemotaktikus választ kiváltani, munkánkat a sejtvonalak ilyen irányú vizsgálatával folytattuk. Ehhez elsőként az ECIS készülék „electric fence” („elektromos kerítés”) funkcióját használtuk. Kísérleteink célja elsődlegesen a három sejtvonal adhéziós/migrációs viselkedésének karakterizálása volt, majd az alkalmasnak talált modelleken a legmagasabb, környezeti szempontból még releváns koncentrációban

(10^{-8} M) vizsgáltuk a 3 kiválasztott hatóanyag (diklofenák, metoprolol és propranolol) hatását a sejtmigrációra.

A kapott impedimetriás görbék, valamint a mikroszkópban az elektród felszínekről készített felvételek alapján a 3 sejtvonal közül kettő, a HaCaT és az MCF7 bizonyultak alkalmas alanyoknak az „electric fence” funkcióval végzett migrációs vizsgálatokhoz. Ezzel szemben a HepG2 sejteknél - feltételezhetően a sejtek többrétegű szigetekben való elhelyezkedése, azaz az elektród körüli konfluens sejtréteg kialakulásának elmaradása miatt - az „electric fence” kikapcsolását követő néhány órában elmaradt a sejtek mérőelektródra történő migrációját jelző ellenállás emelkedés.

A 3 vizsgált gyógyszerhatóanyag migrációra kifejtett hatásával kapcsolatban eredményeink azt mutatatták, hogy egyedül a propranolol módosította szignifikánsan a sejtek migrációját, nevezetesen enyhén lassította a HaCaT keratinociták mozgását. Ez szintén összefügghet a propranolol korábban említett membrán stabilizáló hatásával. Ugyanakkor a másik két szer semleges viselkedése nem teljesen meglepő azon irodalmi adatok tükrében, amelyek e komponensek migrációt befolyásoló hatását lényegesen magasabb (10^{-5} - 10^{-4} M) koncentrációkon írták le.

8. Munkánk záró szakaszában a sejtmigráció egy nemrég leírt formáját, a sejtek környezetének rigiditás gradiense által indukált durotaxist vizsgáltuk. E folyamat olyan jelentős *in vivo* eseményekben játszik kiemelt szerepet, mint a szövetek kialakulása, a sebgyógyulás, vagy a tumorok létrejötte. Jóllehet egyelőre tisztázatlan, hogy az egyes betegségek esetében (pl. tumorok, szívinfarktus) a szöveti környezet mechanikai tulajdonságainak megváltozása kiváltó ok-e, vagy pedig következmény, egyre több kórképben igazolták, hogy a sejteket körülvevő mátrix rugalmassága a fiziológiástól eltér. Ugyanakkor az is igazolódott, hogy pl. a tumorsejtek antineoplasztikus szerekekkel szembeni érzékenysége függ a tenyésztőfelszín rigiditásától. E megállapítás felveti annak lehetőségét, hogy előfordulhat hasonló rigiditás-függő érzékenység a környezeti szennyezőanyagok tekintetében is.

A HaCaT keratinocita és az MCF7 emlő karcinóma durotaktikus viselkedésének karakterizálását célzó kísérleteink azt mutatták, hogy a HaCaT sejtek képesek voltak durotaxissal válaszolni az alkalmazott gélben tapasztalható látszólagos rigiditás különbségekre, míg az MCF7 sejtek nem. Ezt a válaszkészséget a gél felszínén alkalmazott, sejtheadhéziót elősegítő kezelés minősége (poli-D-lizin, vagy fibronectin)

nem befolyásolta. Ugyanakkor a HaCaT sejtek esetében a végtelenül rigid, topográfiailag megmunkált üveglemez felszínére rétegzett rugalmas hidrogél vastagsága (<15 μm vagy >50 μm) meghatározta a sejtek durotaktikus válaszát: az alacsonyabb gélekben tapasztalható volt a durotaxis, a vastagabbakon nem. Egyelőre az irodalmi adatok nem egységesek azon távolság nagyságrendjével (1 - >10 μm) kapcsolatban, amelyen keresztül a sejtek még képesek érzékelni a környezet rigiditását. Eredményeink mindenesetre a 10 μm körüli tartományt látszanak igazolni, ugyanakkor a sejtek által érzékelhető mélység függ a gél felszínére kifejtett erő nagyságától, így sejtípusonként is változhat. Az MCF7 sejtek rigiditás iránti érzéketlenségének magyarázata valószínűleg a sejtek tumoros eredetében keresendő, mivel emlő tumorok esetében leírták, hogy a metasztatikus potenciál emelkedésével párhuzamosan a sejtek elveszítik a környezet rigiditása iránti érzékenységüket. Ez érthető, annak tükrében, hogy a szervezetben a metasztázist képező malignus sejteknek számtalan különböző, ezáltal eltérő mechanikai tulajdonságú szöveten kell átjutniuk. Természetesen a folyamat pontos molekuláris háttere még tisztázására szorul, a fenti felismerés azonban nagyban hozzájárulhat mind a tumorok patomechanizmusának megértéséhez, mind a jelenlegiekénél hatékonyabb tumorterápiák kifejlesztéséhez.

9. A durotaxis jelenségével kapcsolatos számtalan egyelőre tisztázatlan kérdés egyike az egyes citoskeletonális elemek (pl. mikrofilamentumok, mikrotubulusok, miozin II.) szerepe a folyamatban. Munkánk folytatásaként a megfelelő specifikus gátlószerek alkalmazásán keresztül e 3 citoskeletonális komponens szerepét vizsgáltuk. Mivel az említett gátlószerek a sejtek számára igen toxikusak, továbbá a sejtek adhézión és migrációs képességét is csökkenthetik, e fiziológiás válaszokat szintén vizsgáltuk.

Eredményeink azt mutatták, hogy mind a referenciaként használt 3T3 egér fibroblaszt sejtvonalon, mind a HaCaT humán keratinocita sejtvonalon valamennyi szer képes volt a durotaxis gátlására az akut citotoxikus hatás kiváltó koncentrációnál valamivel alacsonyabb tartományban. Ugyanakkor impedimetriás eredményeink alátámasztották, hogy a citoskeletonra ható inhibitorok a durotaxis gátlására alkalmas koncentrációban a sejtadhéziót és a migrációt is jelentősen csökkentették mindkét sejtvonalon. A két sejtvonala összevetése mind a 4 vizsgált paraméter (citotoxicitás, durotaxis, adhézió, migráció) esetében a 3T3 sejtek magasabb érzékenységét mutatta, ami a sejtek

gyengébb adhéziójával és kevésbé szoros elhelyezkedésével állhat összefüggésben. Az irodalmi adatok szintén alátámasztják mind a 3 citoszkéletális elem részvételét a durotaxis kialakításában, bár az egyes komponensek szerepe egyelőre nem teljesen tisztázott. A jelenleg elfogadott álláspont szerint az aktin és a miozin II. motorok a sejt erő kifejtéséhez nélkülözhetetlenek, míg a mikrotubulusok szerepe kérdéses, a folyamatban való részvételük assay és sejt típus függő lehet.

10. A környezeti szennyező anyagok sejt migrációra kifejtett hatását vizsgáló kísérleteink lezárásaként két-két környezeti és klinikai szempontból egyaránt jelentős nemszteroid alapú gyulladáscsökkentő (a diklofenák és az ibuprofén) és β -blokkoló (a metoprolol és a propranolol) durotaxis befolyásoló képességét vizsgáltuk.

Eredményeik alapján elmondható, hogy a 2 gyulladáscsökkentő nem, viszont a 2 β -blokkoló gátolta a sejtek durotaxisát az 1-10 μM (3T3), illetve a 10-100 μM (HaCaT) koncentrációtartományban. Ugyanakkor a sejtek adhézióját az impedimetriás mérések során egyik anyag sem befolyásolta jelentősen, a migrációt is csak a diklofenák, ráadásul két sejtben ellentétes irányba. A 3T3 sejt vonalon lassította, a HaCaT keratinocitáknál enyhén fokozta a sejt migrációt. Mivel egyik molekulacsalád szerepét sem vizsgálták eddig a sejtek rigiditás iránti érzékenységgel, ill. durotaxisával, az eredmények értelmezése igen nehéz és mindenképpen további vizsgálatok szükségességét veti fel. A metoprolol és a propranolol hatásos koncentrációi mindkét sejtben egy nagyságrend eltérést mutattak, mindkét sejt vonalon a propranolol bizonyult hatásosabbnak. Ez valószínűleg a korábban többször említett membránstabilizáló hatásával áll összefüggésben, de szerepet játszhat benne a két szer β -adrenerg receptorok iránti szelektivitásbeli különbsége is. A metoprolol szelektív β_1 -adrenerg receptor inhibitor, amely receptor variáns expressziója a bőr sejtjeiben a β_2 típuséhoz képest alacsonyabb. Ezzel szemben a propranolol nemszelektíven gátolja mind a β_1 -, mind a β_2 -adrenerg receptorok működését, ami magyarázhatja, miért alacsonyabb a propranolol hatásos koncentrációja mind a két sejt vonalon. Mindenesetre kísérleteinkkel először igazoltuk, hogy környezeti szennyezőanyagok befolyásolhatják a sejtek durotaxisát, jóllehet a hatásos koncentrációk a környezeti szempontból releváns tartományhoz képest 2 nagyságrenddel nagyobbak voltak.

Következtetések

- A kis szerkezeti eltéréseket tartalmazó illatanyagok vizsgálatával igazoltuk a *T. pyriformis* kemotaxisának csekély molekulasz szerkezeti eltérések iránti érzékenységét.
- Igazoltuk, hogy a leggyakoribb vízi szennyező gyógyszer-családok tagjainak egyedi proliferáció gátló hatása a vizekben a *T. pyriformis*-ra nem várható.
- A hatóanyagpárokból leírtuk a komponensek egyedi proliferáció gátló hatásának összegződését, sőt szinergista kölcsönhatását, ami az anyagok egyénileg megállapított környezeti kockázatát fokozhatja.
- Igazoltuk, hogy a környezeti szempontból releváns koncentrációban a hatóanyagok képesek a mozgási viselkedést befolyásolni, így a kemotaxis hasznos kvalitatív viselkedési válasz a szennyezőanyagok biológiai aktivitásának megítélésére.
- A diklofenák vákuum-UV fotolíziséből származó minták vizsgálatával gyakorlati példát szolgáltatunk a *T. pyriformis* proliferáció gátlás és kemotaxis teszt-kombináció sikeres felhasználására; továbbá az előbbi módszer és a kémiai elemzés eredményei párhuzamba állíthatónak bizonyultak.
- A humán sejtvonalakon végzett viabilitási vizsgálatokkal igazoltuk, hogy az impedimetriás módszer és a mitokondriális dehidrogenáz módszer eredményei jól korrelálnak, ugyanakkor az előbbi módszer érzékenyebb detektálást tesz lehetővé.
- Megmutattuk, hogy az MCF7 emlőkarcinóma és a HaCaT keratinocita sejtvonal alkalmas modellek az impedancia alapú migrációs assay-kben; valamint, hogy a kiválasztott molekulák közül csak a propranolol képes a migrációt a környezeti szempontból releváns koncentrációban szignifikánsan befolyásolni.
- Az MCF7 és a HaCaT sejtvonal a durotaxis szempontjából eltérően viselkedtek.
- A referenciának választott 3T3 fibroblaszt sejtvonalon és a HaCaT sejtvonalon igazoltuk az F-aktin, a mikrotubulusok és a miozin II. motorok működésének elengedhetetlen voltát az adhézió, a migráció és a durotaxis létrejöttéhez.
- Kimutattuk, hogy két klinikai és környezeti szempontból egyaránt fontos β -adrenerg antagonisták képesek a gyógyászatban alkalmazott terápiás koncentrációtartományban a 3T3 és a HaCaT sejtek durotaxisát gátolni.

Összefoglalás

A sejt migráció egyfelől az egysejtű és soksejtű élőlények működése szempontjából kulcsfontosságú folyamat, másfelől a környezet fizikai és kémiai ingerei által kiváltott igen érzékeny viselkedési válasz. Ez jó alapot teremt az antropogén környezetszennyező anyagok sejtélettani hatásainak a filogenezis különböző szintjein történő vizsgálatához.

Munkánk első szakaszában az édes vízi csillós egysejtű *Tetrahymena pyriformis* proliferációs és kemotaktikus válaszát vetettük össze illatanyagokat, vagy a leggyakoribb környezetszennyező gyógyszerhatóanyagokat alkalmazva. Bár a modellsejt kemotaxisa mind a molekulaszervezet, mind a hatásos koncentrációk tekintetében minden esetben igen érzékenynek bizonyult, a kemotaxisra jellemző hormézis jelensége miatt a gyógyszerek proliferáció gátló hatásának kvantitatív és prediktív ereje a kemotaxisénál jobbnak bizonyult. Ezt kihasználva igazoltuk a hatóanyag keverékek additív, olykor szinergista kölcsönhatásait, amik felhívják a figyelmet arra, hogy a keverékhatások az egyedileg megállapított környezeti kockázatot növelhetik. Ezt követően a proliferáció gátlás méréséből és kemotaxis méréséből álló tesztrendszerünket a diklofenák bontására használt vákuum-UV fotolízis optimális műveleti paramétereink beállításához a gyakorlatban is alkalmaztuk.

Ezek alapján munkánk második fázisában humán sejtvonalakon vizsgáltuk a gyógyszerek citotoxikus hatását, összevetve a hagyományos MTT módszert és az impedancia alapú viabilitás mérést. Ez utóbbit, mint innovatív valós idejű migrációs assay-t is teszteltük. A vizsgált hatóanyagok közül egyedül a propranololról igazolódott, hogy képes a környezeti szempontból releváns koncentrációban bizonyos sejtvonalak migrációját befolyásolni.

Végezetül egy új durotaxis mérésre alkalmas platformon karakterizáltuk a HaCaT humán keratinocita és az MCF7 humán emlő karcinóma sejtvonal rigiditás iránti eltérő érzékenységét. Továbbá e platformon kvantitatívan jellemeztük a citoskeletális elemeket gátló szerek durotaxisra kifejtett hatását. Emellett igazoltuk, hogy a vizsgált klinikai és környezeti szempontból egyaránt jelentős NSAID-k nem, a β -blokkolók azonban képesek a terápiás koncentrációtartományban a durotaxis befolyásolni.

Saját közlemények listája

Az értekezés témájában megjelent közlemények:

1. Láng, J., Rákász, V., Magyar, A., Pállinger, É., Kőhidai, L. (2011) Chemotactic effect of odorants and tastants on the ciliate *Tetrahymena pyriformis*. J. Recept. Sig. Transd 31 (6):423-433 **IF=1,588**
2. Láng, J., Kőhidai, L. (2012) Effects of the aquatic contaminant human pharmaceuticals and their mixtures on the proliferation and migratory responses of the bioindicator freshwater ciliate *Tetrahymena*. Chemosphere 89 (5):592-601 **IF=3,137**
3. Arany, E., Láng, J., Somogyvári, D., Láng, O., Alapi T., Ilisz, I., Gajda-Schranz, K., Dombi, A., Kőhidai, L., Hernádi, K. (2014) Vacuum-ultraviolet photolysis of diklofenák and the effect of the treated aqueous solutions on the proliferation and migratory responses of *Tetrahymena pyriformis*. Sci. Tot. Environ. 468-469: 996-1006

Egyéb megjelent közlemények:

1. Láng, O., Illyés, E., Menyhárd D.K., Láng, J., Sebestyén, F., Hudecz, F., Kőhidai, L. (2012) Chemotaxis induced by SXWS tetrapeptides in *Tetrahymena*—overlapping chemotactic effects of SXWS sequences and their identical amino acids. J. Mol. Recogn. 25 (1):24-31 **IF=3,006**
2. Mező, G., Láng, O., Jakab, A., Bai, K.B., Szabó, I., Schlosser, G., Láng, J., Kőhidai, L., Hudecz, F. (2006) Synthesis of oligotuftsins based branched oligopeptide conjugates for chemotactic drug targeting (CDT) J. Pept. Sci. 12:328-336 **IF=1,801**