

**Kis molekulatömegű szerves vízi szennyezőanyagok
hatása a sejtadhézióra és migrációra
– A sejtadhézió és migráció alkalmazhatósága
ökotoxikológiai végpontként –**

Doktori értekezés

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 osztályvezető, 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

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	5
1. Bevezetés	6
1.1. A sejtmigráció biológiai jelentősége	6
1.1.1. A sejtek mozgásának alapvető típusai	7
1.1.2. A sejtmigráció molekuláris biológiai háttere	10
1.1.3. Az extracelluláris tér kémiai és fizikai jeleinek érzékelése és továbbítása ...	14
1.2. Gyógyszerhatóanyagok a vízi környezetben	19
1.2.1. Gyógyszerhatóanyagok bekerülése és sorsa a környezetben	20
1.2.2. A vizsgált hatóanyagok előfordulása a környezetben	22
1.2.3. Technológiák a vizeket szennyező gyógyszerek eltávolítására.....	24
1.2.4. Gyógyszerek ökotoxikológiai értékelésére használt biológiai tesztek	26
1.2.5. Környezetszennyező gyógyszerek ökotoxicitás predikciójának nehézségei. 30	
1.2.5.1. A keverékek globális hatásának becslésére alkalmazott modellek.....	32
1.3. A vizsgált modell-sejtek főbb jellemzői	34
1.3.1. <i>Tetrahymena pyriformis</i> eukarióta csillós egysejtű.....	34
1.3.2. Humán sejtvonalak	34
2. Célkitűzések	36
3. Anyagok és módszerek	40
3.1. Felhasznált anyagok	40
3.1.1. Illatanyagok	40
3.1.2. Gyógyszerhatóanyagok	42
3.1.3. Gyógyszerhatóanyag kombinációk	42
3.1.4. Diklofenák vákuum-UV (VUV) fotolíziséből származó minták.....	44
3.2. Modell sejtek és fenntartásuk	45
3.2.1. <i>Tetrahymena pyriformis</i> eukarióta csillós egysejtű.....	45
3.2.2. HaCaT humán keratinocita sejtvonal	45

3.2.3. HepG2 humán hepatocelluláris karcinóma sejtvonal	45
3.2.4. MCF7 humán emlőkarcinóma sejtvonal	45
3.2.5. 3T3 egér fibroblaszt sejtvonal	46
3.3. Csillós egysejtű modellen végzett vizsgálatok	46
3.3.1. <i>Tetrahymena pyriformis</i> proliferáció gátlás vizsgálat	46
3.3.2. Kapilláris kemotaxis assay	47
3.3.3. CASY TT sejtszámláló és analizáló készülék	48
3.3.4. Foszfatidil-inozitol-3-kináz (PI3K) gátlás.....	48
3.3.5. Foszfolipáz-C aktivációjának vizsgálata	49
3.4. Sejtvonalakon végzett vizsgálatok.....	50
3.4.1. Mitokondriális szukcinát-dehidrogenáz alapú (MTT) viabilitás assay	50
3.4.2. AlamarBlue® viabilitás assay	51
3.4.3. Impedancia alapú technikák	51
3.4.3.1. Citotoxicitás vizsgálat.....	53
3.4.3.2. Migrációmérések	54
3.4.4. Durotaxis assay.....	57
3.5. Statisztikai kiértékelés	58
3.5.1. Gyógyszerhatóanyagok koncentráció-hatás görbéinek meghatározása	59
3.5.2. Kölcsönhatások kiértékelése a kétkomponensű hatóanyag keverékekben....	59
4. Eredmények	60
4.1. Csillós egysejtű modellen végzett vizsgálatok	60
4.1.1. Íz-és illatanyagok sejtélettani hatásai	60
4.1.1.1. Íz- és illatanyagok kemotaktikus hatása	61
4.1.1.2. A foszfolipáz-C és a foszfatidil-inozitol-3-kináz aktivációja a kemoattraktáns észterek szignalizációja során	64
4.1.2. Gyakori vízi szennyező gyógyszerhatóanyagok sejtélettani hatásai	65

4.1.2.1. Gyógyszerhatóanyagok proliferáció gátló hatása	66
4.1.2.2. Gyógyszerhatóanyag keverékek proliferáció gátló hatása	68
4.1.2.3. Gyógyszerhatóanyagok kemotaktikus hatása	74
4.1.3. Diklofenák AOP bontásából származó minták vizsgálata.....	77
4.1.3.1. A diklofenák VUV fotolíziséből származó minták kémiai elemzése	78
4.1.3.2. A diklofenák VUV fotolíziséből származó minták sejtbiológiai hatása	80
4.2. Sejtvonalakon végzett vizsgálatok.....	83
4.2.1. Vízi szennyező gyógyszer-molekulák hatása a sejtviabilitásra	84
4.2.1.1. A modell sejt és az expozíciós idő kihatása a mitokondriális szukcinát-dehidrogenáz (MTT) assay érzékenységre	84
4.2.1.2. Impedimetria alapú, valós idejű sejtviabilitás mérés alkalmazhatóságának vizsgálata szelektált hatóanyagokkal.....	86
4.2.2. Szelektált gyulladáscsökkentők és β -blokkolók hatása a migrációra.....	89
4.2.2.1. Az ECIS „electric fence” technika alkalmazhatóságának vizsgálata	89
4.2.2.2. Durotaxis vizsgálatok	91
4.2.2.3. Durotaxis gátló szerek hatása a sejtadhézióra és migrációra.....	95
5. Megbeszélés	98
6. Következtetések	113
7. Összefoglalás	114
Summary	115
8. Irodalomjegyzék	116
9. Saját publikációk jegyzéke	137
10. Köszönetnyilvánítás.....	138
11. Függelék.....	139

Rövidítések jegyzéke

2D: kétdimenziós	MCF7: humán emlőkarcinóma sejtvonala
3D: háromdimenziós	Met: metoprolol
3T3: egér fibroblaszt sejtvonala	MTT: 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolium bromid
AOP: nagyhatékonyságú oxidációs eljárás	MW: moláris tömeg (g/mol)
C: koncentráció (mol/l, M)	N: sejtszám
c-AMP: ciklikus-AMP	n.m.: nem meghatározható
c-GMP: ciklikus-GMP	NSAID: nemszteroid gyulladáscsökkentő
CYP: citokróm-P450 enzimek	OD: optikai denzitás
DMSO: dimetil-szulfoxid	PAA: poliakrilamid
Dik: diklofenák	PAH: poliaromás szénhidrogén
EC: effektív koncentráció	PBS: foszfát-puffer
ECIS: Electric Cell Substrate Impedance Sensing	PDL: poli-D-lizin
ECM: extracelluláris mátrix	PI3K: foszfatidil-inozitol-3-kináz
ED: endokrin perturbátor	pKa: savi disszociációs állandó
Ibu: ibuprofén	PLC: foszfolipáz-C
IP ₃ : inozitol 1,4,5-triszfoszfát	Pro: propranolol
IU: Nemzetközi Egység	QSAR: Quantitative Structure-Activity Relationship
dH ₂ O: desztillált víz	Prolif. Inh.: proliferáció gátlási index (%)
HaCaT: normál humán keratinocita sejtvonala	SD: standard deviáció
HepG2: humán hepatocelluláris karcinóma sejtvonala	SE: standard hiba
Ktx. Ind.: Kemotaxis Index (%)	TE: Toxikus Egység
K _{o/w} : oktanol/víz megoszlási hányados	VUV: vákuum-UV
logP ₃ : oktanol/víz megoszlási hányados szimulációval becsült értéke	Z: Impedancia (Ohm)
LOQ: kvantifikálási határ	x: szignifikanca szint; p < 0,05
	y: szignifikanca szint; p < 0,01
	z: szignifikanca szint; p < 0,001

1. Bevezetés

1.1. A sejt migráció biológiai jelentősége

A sejtek mozgása régóta, a fénymikroszkópia 18. századi megjelenése óta ismert és intenzíven kutatott általános biológiai jelenség. A baktériumoktól a gerinces élőlényekig a filogenezis valamennyi szintjére jellemző a sejtek helyváltoztató képessége, továbbá a magasabb rendű szervezeteket felépítő sejt típusok csaknem mindegyike képes migrációra.

Az evolúció korai szakaszában, az egysejtű élőlények szintjén a migráció – a megfelelő jelfelismerő szerkezetek, a receptorok kialakulásával együtt –, a szelektív folyamatok részeként lehetővé tette a táplálékmolekulák megközelítését, valamint a káros, mérgező anyagok elkerülését. E viselkedési válasz ökológiai, ökotoxikológiai szempontból is igen fontos, hiszen a környezetben megtalálható egysejtű élőlények számtalan számukra potenciálisan mérgező kémiai komponenssel (pl. antropogén szennyező anyaggal) kerülnek fizikai közelségbe, akár a talajban, a vizekben, vagy a levegőben. Ugyanakkor a soksejtű szervezetekben a sejtek helyváltoztatása számos fiziológiai vagy patológiai folyamat kulcsfontosságú eleme, amelyet biokémiai és fizikai tényezők egymásra épülő komplex és egyedi rendszereinek sokasága határoz meg. Ilyen élettani események i) a megtermékenyítés, ii) az egyedfejlődés során az egyes szervek kialakulása, iii) a sebgyógyulás és iv) az immunsejtek állandó „járőrözése”. A kóros folyamatok közül példaként említhetjük a krónikus gyulladással járó kórképeket, vagy a tumorok áttétképzését, amelyeket a sejtek – a fiziológiai állapothoz képest – megnövekedett migrációs képessége jellemzi.

Mindezek alapján egyértelmű, hogy a sejt migráció alapvető jelentőségű sejtélettani, illetve szervezetszintű jelenség, amelynek vizsgálata, biológiai relevanciájának köszönhetően, számos határterület (pl. viselkedésbiológia, ökotoxikológia, tumorbiológia, gyógyszerfejlesztés) számára értékes eszközt jelent. Ugyanakkor a folyamat következő fejezetekben bemutatott heterogenitása és komplexitása miatt e terület számtalan tisztázatlan kérdést és megoldatlan kihívást tartogat.

1.1.1. A sejtek mozgásának alapvető típusai

Az élő szervezetek, vagy akár a sejtek által a környezet ingereire adott migrációs válaszok a kiváltó ingerek sokfélesége és a kialakuló mozgásformák változatossága miatt igen nagy heterogenitást mutatnak. Ez indokolja a különböző típusok elkülönítését, noha az osztályozás alapjául többféle szempont is szolgálhat.

A csoportosítás egyik lehetséges alapja a helyváltoztatás térbeli meghatározottsága. Az adott stimulus által indukált random irányú migrációs válasz a *kinézis*, amelynek két típusa az ortokinézis (a mozgás lineáris sebessége változik meg) és a klinokinézis (az irányváltoztatások frekvenciája változik meg) (1). E két, első ránézésre hasonló fogalmat elsősorban az ökológia használja, és amint azt szimulációs eredmények igazolták, a két típus biológiai szerepe eltér. Azokban az esetekben ugyanis, amikor a mozgást a stimulus aktuális intenzitása határozza meg, a térbeli orientációban mind az ortokinézis, mind a klinokinézis szerepet játszik; ugyanakkor, ha a mozgást a stimulus változásának erőssége diktálja, a helyváltoztatás tisztán klinokinézis révén valósul meg (2). Ez alapján például egy gradienst tartalmazó térben az élőlény klinokinezissel térképezi fel a teret és jut el az adott inger szempontjából legkedvezőbb intenzitású területre, az ott töltött idő maximalizálásához azonban mind klinokinézist, mind ortokinézist megvalósít.

A kinézissel ellentétben, a *taxis*nál a kiváltó inger térbeli változása (gradiense) meghatározza a helyváltoztatás irányát. A pozitív taxisnál a helyváltoztatás az inger növekvő intenzitása felé mutat, míg a negatív taxisnál éppen ellenkezőleg, az ingercsökkenés irányába. A taxisok csoportosításának egyik lehetséges alapját a kiváltó fizikai vagy kémiai stimulusok adják (1. táblázat).

A legnagyobb szakirodalmi feldolgozottságú a kémiai anyagok által kiváltott *kemotaxis*, ami az egysejtű és többsejtű élőlények életműködése szempontjából egyaránt jelentős mozgásforma. Ennek speciális esete az *aerotaxis*, amely viszont elsősorban a különböző oxigénigényű és -toleranciájú baktériumokra jellemző (3). A fizikai ingerek által kiváltott taxisok közül a *fototaxis* és a *magnetotaxis* szintén főként a prokarióta és eukarióta egysejtűekre jellemző mozgásformák (4). Ugyanakkor a *galvanotaxis* és a *mechanotaxis* a soksejtű szervezetekben *in vivo*, pl. a szöveti fejlődés, vagy az angiogenezis során előforduló folyamatok (5; 6). A sejtek mechanikai ingerek által

kiváltott irányított mozgásának egy nemrég leírt (7), jelenleg igen intenzíven kutatott formája a *durotaxis*, amit a sejt számára 2D vagy 3D környezetet jelentő mátrix rigiditás („*stiffness*”) gradiense vált ki. E mozgásforma olyan jelentős *in vivo* eseményekben játszik szerepet, mint az őssejt differenciáció (8; 9), vagy a sebgyógyulás (10).

1. táblázat. A sejtek mozgását irányítani képes legfontosabb fizikai és kémiai tényezők

Indukáló tényező	Mozgásforma*	Példa
kémiai anyag	kemotaxis	neutrofil granulociták IL-8 kemokin indukálta migrációja (11)
oxigén	aerotaxis	mikroaerofil tengeri baktériumok akkumulációja a megfelelő vízrétegben (12)
hő	thermotaxis	emlős spermiumok tájékozódása a nőtény genitális traktusban (13)
fény	fototaxis	<i>H. pluvialis</i> ostoros alga fototaxisa (14)
elektromos tér	galvanotaxis	kétéltűek velőcső sejtjeinek mozgása a katód felé <i>in vitro</i> (6)
mágneses tér	magnetotaxis	mélytengeri baktériumok magnetotaxisa (12)
nyírófeszültség	mechanotaxis	vaszkuláris endotél sejtek folyadékáram indukálta migrációja (5)
rigiditás	durotaxis	fibroblasztok akkumulációja a magas rigiditású területeken gradienst tartalmazó géleken (7)

*Piros szín jelöli az értekezésben tárgyalt mozgásformákat

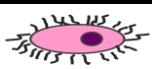

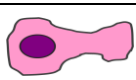
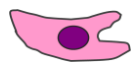
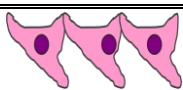

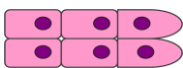
Az előbbi felosztáson túl az irányított sejtmozgásnak eltérő formáit különíthetjük el a mozgó sejtek morfológiája és száma alapján is (2. táblázat).

Egysejtes migráció megvalósulhat csillós, ostoros, amőboid vagy mezenhimális mechanizmus révén. A *csillós mozgás* az egysejtű élőlényekre jellemző, prokariótákban és eukariótákban más-más mozgási mechanizmus révén kialakuló, mozgásforma, amelynek létrejöttéhez nem szükséges a sejtek kitapadása. Az ostoros és amőboid mozgásra egysejtűeknél és soksejtűeknél egyformán található példa. Míg az *ostoros mozgás* kialakulása szintén nem feltételezi a sejtek felszínhez való kitapadását, addig az *amőboid mozgás* létrejöttéhez szükséges a sejtek gyenge adhéziója (15). E mozgástípust elsőként a *D. discoideum* amőbánál írták le, azonban a soksejtű szervezetekben is megfigyelhető, elsősorban a fehérvérsejtekre, illetve számos tumorra jellemző. A *mezenhimális migráció* egyértelműen a soksejtű szervezetek sejtjeinek (pl. kötőszöveti sejtjeinek) jellegzetes mozgási mechanizmusa, amelynek során az orsó alakú sejt integrinklaszterek révén szoros adhéziós kapcsolatban áll a mozgási felszínnel.

Ellentétben az amőboid mozgással, amelynek során a sejtek fokozott kontrakciós erők kifejtése révén mintegy átréselik magukat az extracelluláris mátrix (ECM) rétegein, a mezenhimálisan mozgó sejtek mátrixmetalloproteinázok (MMP-k) termelése révén részlegesen elbontják maguk körül az ECM elemeket. Ezen utóbbi két mozgásformával kapcsolatban mindenképpen meg kell azonban jegyezni, hogy a soksejtű szervezetek különböző típusú sejtjei egyedi kontraktilitásuktól, a felszín rugalmasságától és egyéb tényezőktől függően folytonos átmenetet képviselhetnek az amőboid és a mezenhimális migráció között (16).

A magasabbrendű élőlények egyedfejlődése, valamint a tumorok kialakulása során szerepet játszó soksejtű migráció két legfőbb válfaja a „*streaming*”, és a *kollektív migráció*. Az előbbi jellemzője, hogy az egyszerre mozgó sejtek között nem feltétlenül alakulnak ki sejt-sejt kapcsolatok. A sorban egyedileg haladó sejtek migrációja megvalósulhat amőboid vagy mezenhimális mechanizmus révén is (15). A kollektív migráció közben ezzel szemben az egy egységként koordináltan együtt haladó sejteket a közöttük fennálló erős sejt-sejt kapcsolatok tartják össze, amelyben elsősorban a kadherineket, de más sejt-sejt kapcsolatot biztosító fehérjék is részt vehetnek (17). E forma jellemző pl. a sebgyógyulásnál a sebszéleket alkotó sejtlemezek mozgására.

2. táblázat. A sejt migráció típusai a mozgó sejtek morfológiája és száma alapján (17)

	Mechanizmus		Sejttípus, példa
Egysejtű	csillós		<ul style="list-style-type: none"> • <i>T. pyriformis</i> egysejtű
	ostoros		<ul style="list-style-type: none"> • <i>D. salina</i> alga • emlős spermium
	amőboid		<ul style="list-style-type: none"> • <i>D. discoideum</i> amőba • fehérvérsejtek
	mezenhimális		<ul style="list-style-type: none"> • fibroblaszt, • keratinocita
Soksejtű	amőboid „streaming”		<ul style="list-style-type: none"> • <i>D. discoideum</i> • velőcső kialakulása
	mezenhimális „streaming”		<ul style="list-style-type: none"> • epitel eredetű tumorsejtek
	kollektív migráció		<ul style="list-style-type: none"> • sebgyógyulás • gasztruláció

*Piros szín jelöli a munkánk során vizsgált mozgásformákat

Bár amint az bemutatásra került, a sejtípustól és környezetétől függően a sejt migráció igen változatos típusai jöhetnek létre, az ezek megvalósítását végző molekuláris elemek és mechanizmusok igen konzerváltak. A következőkben ezek rövid bemutatására törekszünk.

1.1.2. A sejt migráció molekuláris biológiai háttere

Az eukarióta sejtek helyváltoztatása az önszerveződő polimerhálózat *citoszkeleton* működése révén valósul meg. Ezen evolúciósan konzervált fehérjékből álló vázrendszer mellett, hogy biztosítja a sejt mozgásához szükséges erők generálását, térben organizálja a sejt tartalmát, valamint fizikailag és biokémiailag összekapcsolja a sejtet a környezetével. A három fő citoszkeletonális polimertípus mindegyike egy-egy hálózatba szerveződik, amelyek alapvetően i) mechanikai tulajdonságaikban, ii) összeszerelődésük/lebomlásuk dinamikájában, iii) polaritásukban, iv) a hozzájuk kapcsolódó molekuláris motorokban s mindezek által v) funkciójukban különböznek. Ugyanakkor e hálózatok egymással és a többi sejtalkotóval is rendkívül bonyolult kapcsolatban állnak egyrészt nonspecifikus (pl. sztérikus) interakciókon keresztül, másrészt a megfelelő összekapcsoló fehérjék segítségével kialakuló specifikus kölcsönhatások révén.

A heterodimer α - és β -*tubulin* egységekből létrejövő csőszerű *mikrotubulusok* (\varnothing 24 nm) a citoszkeleton legmerevebb struktúrái (18), emellett ezek mutatják a legdinamikusabb polimerizációs-depolimerizációs viselkedést. E „dinamikus instabilitásra” az jellemző, hogy a mikrotubulusok alapvetően két állapot között „kapcsolgatnak”: a „stabil növekedés”, vagy a „villámgyors lebomlás” között, amelyeket a globuláris monomerekhez kapcsolódó GTP kötése, vagy hidrolízise vált ki. A fentebb említett két tulajdonságuknak köszönhetően a mikrotubulusok funkciója elsődlegesen a citoplazma gyors „letapogatása” és a sejtorganellek mozgási pályájának kijelölése. Bár a sejtek mozgásában az aktin hálózat játssza az elsődleges szerepet, a specifikus mikrotubulus gátlószerekkel (3. táblázat), pl. kolhicinnal és nokodazollal végzett kísérletek azt igazolták, hogy mikrotubulusok működése is szükséges a sejtek irányított mozgásának létrejöttéhez (19; 20). Emellett a mikrotubulusok adják az eukarióta csilló fő tömegét is, rendkívül jellegzetes $9 \times 2 + 2$ struktúrába szerveződve.

A globuláris *aktin* (G-aktin) monomerből ATP-igényes folyamatban polimerizálódó kettős hélix szerkezetű fibrilláris (F-aktin) *mikrofilamentumok* (\varnothing 6 nm) mechanikai szempontból jóval rugalmasabbak a mikrotubulusoknál. Ugyanakkor a változatos geometriájú mikrofilementum hálózatok rigiditását az F-aktint keresztkötő fehérjék minősége és mennyisége is befolyásolja (18). A mikrofilamentumok felépülése-lebomlása a mikrotubulusokéhoz képest kevésbé dinamikus folyamat, inkább a lokális szignalizációs események által szabályozott, kiegyensúlyozott növekedés jellemző rájuk. E tulajdonságaiknak köszönhetően a mikrofilamentumok döntő szerepet játszanak a sejtek morfológiájának meghatározásában, valamint a sejtek mozgásában. Például a sejtmigráció első lépésében a polarizált sejt vezető oldalán kialakuló kitüremkedések (lamellopodiumok vagy filopodiumok) létrejöttét a mikrofilamentumok polimerizációja irányítja (16). Emellett a sejt mozgásához szükséges húzó- és tolóerők generálását a miozin II motorokkal összehangolt működésben szintén a mikrofilamentumok kontrakciója/elongációja biztosítja. Az aktin sejtmozgásban betöltött központi szerepét bizonyítják a specifikus gátlószereivel, pl. citokalazinokkal (3. táblázat) végzett kísérletek is, amelyek igazolták, hogy az aktinműködés hiányában a sejt mozgásképtelen (20), megváltozik az alakja és adhéziós képessége (21), továbbá drasztikusan csökken a sejt által a felszínre kifejtett húzó erők nagysága (22).

3. táblázat: *A citoskeletális elemek működését gátló, a dolgozatban tárgyalt szerek*

Polimer / Citszkeletális elem	Gátlószer	Hatásmechanizmus
F-aktin	citokalazin-B	polimerizáció gátlása
	citokalazin-D	
	falloidin	stabilizálás, depolimerizáció gátlása
mikrotubulus	kolhicin	polimerizáció gátlása
	nokodazol	polimerizáció gátlása
miozin II.	blebbistatin	aktint nem kötő miozin II-t gátolja annak „feji” részéhez kötődve (23)
protein foszfatáz 1 és 2A (PP1 és PP2A) inhibitor	kalikulin-A	a foszfatáz gátlásán keresztül a miozin II aktivitást fenntartja (24)

Mivel mind az aktin mikrofilamentumok, mind a mikrotubulusok polarizáltak, így megfelelő pályát jelentenek a molekuláris motorok aszimmetrikus mozgása számára. A dinein és kinezin család tagjai a mikrotubulusokon, a miozin család elemei a

mikrofilamentumok mentén képesek elmozdulni. Míg az előbbiek többek között a csillók mozgásában játszanak jelentős szerepet, addig az utóbbiak az aktinnal együtt hozzák létre kontraktilis aktomiozin kötegeket. Ezek megrövidülése biztosítja a sejt által a felszínre kifejtett húzó erőket (16). Éppen ezért a miozin működésének specifikus szerekekkel (pl. blebbistatinnal vagy kalikulinnal) történő modulálása kihat a sejt motilitására és kontraktilitására (21; 25; 26).

Az utolsó nagy polimercsoport, az állati sejtekben megtalálható *intermediér filamentumok* szerkezete jelentősen különbözik az eddig említett struktúráktól. Monomerjeik egy viszonylag konzervatív α -helikális centrális részből, valamint változatos összetételű N- és C-terminális szakaszból állnak. A polimer intermediér filamentumok 8 antiparallel tetramer egységből felépülő protofilamentum összefonódásával jönnek létre. Ezek mind méretüket (\emptyset 8–12 nm), mind mechanikai tulajdonságaikat tekintve átmenetet, úgymond „puffert” képeznek a mikrotubulus és a mikrofilamentum hálózat között, ugyanakkor ezek a citoskeleton legrugalmasabb elemei. Monomerjeik általában sejt-, illetve szövetspecifikus előfordulást mutatnak, bár a sejttag lamin intermediér filamentumai minden magvas sejt típusban megtalálhatóak. Szerepüket tekintve igen fontosak a sejt mechanikai integritásának, valamint a mechanikai stresszel szembeni ellenállóképességének biztosítása szempontjából. Erre példa a keratinociták keratin (27), vagy az endotél sejtek vimentin (28) hálózata, amelyek fontos szerepet játszanak abban, hogy e sejtek ellenállnak az őket érő rendkívüli mechanikai feszültségeknek.

A három fő építőelem mellett számtalan regulátor fehérje is részt vesz a sejt váz kialakításában (18). Ezek funkciójukat tekintve lehetnek: i) a filamentum képződést elindító *nukleációs faktorok*; ii) a filamentumokat termináló „*capping*” *fehérjék*; iii) *polimerázok*; iii) *depolimerázok*; iv) *hasító enzimek* és v) a filamentumok magasabb szintű szerveződését biztosító *keresztkötő és stabilizáló fehérjék*. E fehérjék jelenléte és működése következtében az eukarióta sejtekben a polimerizáció illetve a depolimerizáció sebessége jelentősen eltér az *in vitro* körülmények között megfigyelttől.

A soksejtű szervezetekben megfigyelhető letapadásfüggő migráció típusok lezajlásához nélkülözhetetlenek az *extracelluláris mátrix* (ECM) által biztosított fizikai közeg és az ehhez kapcsolódni képes megfelelő *adhéziós receptorok* is. Az ECM összetétele,

topográfiája és mechanikai tulajdonságai rendkívül fontos stimulusokat biztosítanak a sejtek számára, amelyek nem csak a sejtadhéziót, vagy migrációt, de a génexpressziót, proliferációt vagy differenciációt is meghatározzák (29). Az ECM felől érkező mechanikai és biokémiai információk érzékeléséért és sejtmembránon keresztüli közvetítéséért a megfelelő adhéziós receptorok (pl. integrinek, CD44) felelősek, amelyek egyúttal a citoplazmából érkező jelek extracelluláris tér felé való továbbítását is biztosítják (30). Legjelentősebb ilyen molekulák az α - és β -alegységből felépülő heterodimer *integrin* fehérjék. Míg az α -alegység extracelluláris része felelős a megfelelő ECM-komponens kötéséért és a ligandspecifitásért, addig a β -alegység intracelluláris doménjei adaptor és egyéb fehérjékkel komplexben kapcsolódnak a citoszkeletonhoz. Az α -, ill. a β -alegység alapján jelenleg 24 különböző ligandspecifitású és affinitású integrin családot különít el az irodalom (31). Mivel az integrineknek nincs intrinzik enzimaktivitásuk, ezért a sejten belüli jelátvitel érdekében további citoplazmatikus fehérjék kapcsolódnak hozzájuk. Ezek lehetnek:

- i) *integrinkötő fehérjék* (pl. talin), amik az integrin aktivációját, működését regulálják;
- ii) *adaptor vagy vázfehérjék* (pl. vinkulin, paxillin, α -aktinin), amelyek az integrinkötő molekulákat a citoszkeletonhoz (általában az aktinhoz) kapcsolják;
- iii) *enzimek* (pl. fokális adhéziós kináz (FAK), Src kináz) (29).

Az ECM-sejt kapcsolatokat biztosító receptorokon kívül a sejt-sejt kapcsolatért felelős integráns membránfehérjék is mindenképp említést érdemelnek, hiszen ezek fontos szerepet játszanak a migráció kollektív (soksejtes) formájánál a sejtek biokémiai és mechanikai összekapcsolásában. A kollektív migráció szempontjából legjelentősebb csoportjuk az azonos típusú sejteket összekötő kadherine családjá, valamint az azonos, vagy különböző típusú sejteket összefogó immunglobulin szupercsaládba tartozó fehérjék (15; 32).

Összegezve elmondható tehát, hogy a sejt migráció egy nagyszámú molekula összehangolt, komplex működését feltételező sejtélettani reakció. A sejtek azon molekuláris gépezeteit, amelyek a migrációt reguláló biokémiai és mechanikai jelek érzékelését és továbbítását végzik a következő 1.1.3. fejezet mutatja be.

1.1.3. Az extracelluláris tér kémiai és fizikai jeleinek érzékelése és továbbítása

A kémiai szignálok sejtáttali percepciójáról és a jelátvitelben résztvevő mechanizmusokról ma már, hála a hosszútávra visszatekintő kutatásoknak, elég pontos ismereteink vannak. Ugyanakkor lényegesen kevesebb információval rendelkezünk az ECM mechanikai tulajdonságai révén közvetített információk sejt által történő érzékeléséről, feldolgozásáról. Mivel a két szignál típus alapvetően eltérő természetű (4. táblázat) szükségszerű, hogy az érzékelésükre képes szenzorok, jeltovábbító molekulák és mechanizmusok tekintetében is jelentős különbségek legyenek. Ugyanakkor a kétféle szignalizációban szerepelhetnek ugyanazon molekulák (pl. integrinek) (33), ill. a szignálok által szabályozott sejtéletani válasz (pl. migráció, differenciáció) is lehet azonos (34).

4. táblázat: A biokémiai és mechanikai szignalizáció összehasonlítása (34)

	Biokémiai	Mechanikai
Mechanizmus	diffúzió	fizikai elmozdulás
Terjedés	folyadék fázisban áramlással	ECM-ről sejtre, sejtről sejtire közvetlen, vagy az ECM közvetítésével
Lencsengés (2D-ben)	\sim távolság ² szerint, egyenletes	\sim lineáris, irányfüggő
Hatótávolság	néhányszor 10 μ m	nem limitáló, a mátrix reológiai tulajdonságaitól függ
Jel keletkezése	általában lassabb (molekula <i>de novo</i> szintézise)	gyorsabb

A durotaxist kiváltó jelérzékelési és átviteli folyamatokról egyelőre rendkívül hiányosak az ismereteink. Egyáltalán nem tisztázott például, hogy milyen módon képes a sejt az őt körülvevő mátrix rigiditását érzékelni, tesztelni (35). Ugyancsak kérdéses, mekkora az a karakterisztikus távolság, amelyen keresztül érzékelni képes e rigiditást és mennyi a folyamat időállandója (34). Az első kérdéssel ellentétben ez utóbbiak megválaszolásához találunk néhány fogódzót az irodalomban, bár az adatok ellentmondásosak. A sejtek által letapogatott mélység nagyságrendjét egy változó elaszticitású PDMS tüskéket tartalmazó mikroarrayen végzett kísérlet során $>2 \mu$ m-ban határozták meg (36); morfológiai megfigyelések alapján azonban ez 10-20 μ m-nek adódott (37). A folyamat időigényének pontos megállapítását az általunk alkalmazott

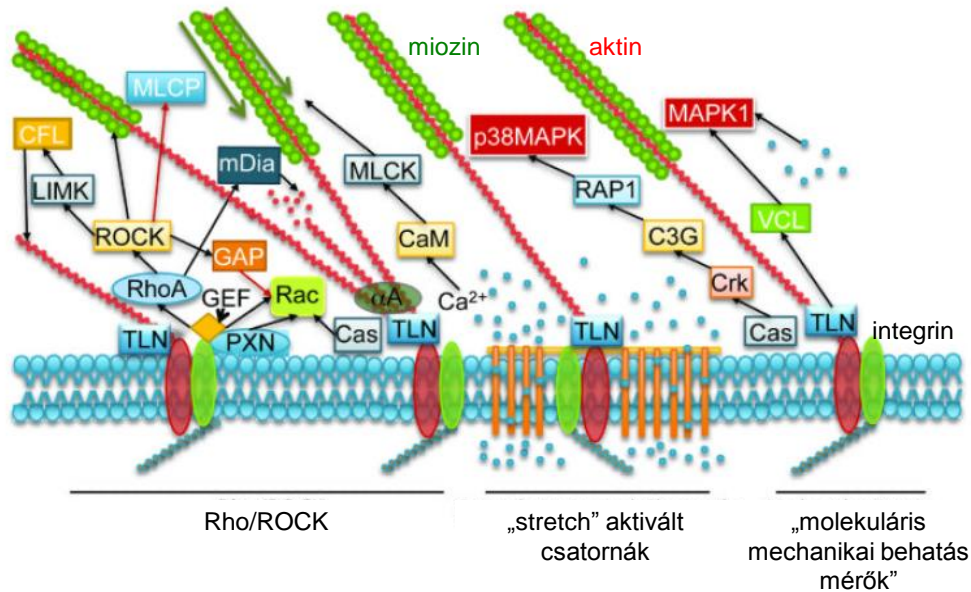
módszerek viszonylag alacsony idő felbontása (másodperc-perc) nehezíti meg, morfológiai megfigyelések alapján 2 percről számoltak be (38), míg a szövetek reológiai tulajdonságai alapján 0,1 s-os nagyságrendet állapítottak meg (39). Avval kapcsolatban szintén megoszlanak a vélemények, hogy a sejten belülrre közvetített mechanikai inger minden esetben biokémiai jellé alakul-e, vagy esetleg mechanikai úton jut-e el pl. a sejtmagba (40).

A sejt elsődleges mechanoszenzorai minden bizonnyal az integrinek, azon belül is a β 1-integrinek a legjelentősebbek (30), továbbá igen fontos szerepe van a fokális adhézis molekula komplexnek, ami az integrinek ligandkötését követően megteremti a kapcsolatot az integrinek intracelluláris doménje és az aktin citoskeleton között (41; 42). Innentől a szignál transzdukciójára 3 különböző mechanizmust feltételez az irodalom, amelyek ráadásul pozitív vagy negatív visszacsatolások révén egymás működését is befolyásolhatják. Az egyes mechanizmusokban résztvevő legjelentősebb molekulákat az 1. ábra mutatja be.

1. A *Rho/ROCK (Rho associated protein kinase) útvonal* mechanotranszdukcióban történő részvétele a citoskeleton működésével és a sejt kontraktilitásával összefüggő szerepe miatt feltételezhető. Az integrinek ligand kötését követően a fokális adhézis komplex közelében található GEF (guanidin-exchange factor) több Rho GTPáz (pl. RhoA, Rac) fehérje aktivációját indítja be, amely több lépcsőn keresztül az aktin nukleációjához, majd a mikrofilamentumok elongációjához és a miozin motorok aktivációjához vezet. Ezáltal a folyamat összességében a sejt kontraktilitásának fokozódásához vezet (43).

2. Az ú.n. „*stretch activated ionchannels*” („feszülés” aktivált ioncsatornák) olyan membrán csatornák, amelyeknek nyitott vagy csukott állapotát a sejtmembrán „feszülése” határozza meg. Ez utóbbira mind a mátrix felől érkező mechanikai terhelés, mind a citoskeleton által kifejtett kontraktilis erők kihatással vannak (44). Jóllehet egyelőre nem sikerült e csatornák specifikus, a mechanikai érzékelés folyamatára jellemző családját azonosítani, Ca^{2+} permeabilitásuk miatt a TRP (transient receptor potential) csatornák állnak jelenleg az ilyen irányú kutatások középpontjában. A feltételezett szignálútvonal lényege, hogy a membrán feszülésének fokozódására az ioncsatornákon keresztül Ca^{2+} beáramlás történik (45), ami a kalmodulinon keresztül

aktiválja a miozin könnyűlanc kinázt (MLCK), amely végülis a miozin könnyű lánccal foszforilációjával a sejt kontraktilitását fokozza (43). (Emellett természetesen a megnövekedett intracelluláris Ca^{2+} koncentráció egyéb szignalizációs útvonalak működésére is kihatással lehet).



1. ábra: A mechanotranszdukció 3 feltételezett útvonala i) Rho/ROCK útvonal, ii) „feszülés” aktivált ioncsatornák, iii) „molekuláris mechanikai mérők” (43);
A legjelentősebb molekulákat jelölő rövidítések: TLN-talin, Cas-p130Cas, VCL-vinkulin, CaM-kalmodulin, MLCK-miozin könnyűlanc kináz, MLCP-miozin könnyűlanc foszfatáz, CFL-kofilin, LIMK-LIM kináz, AA- α -aktinin, PXN paxilin, GEF-guanidín exchange factor; ROCK: Rho associated protein kinase

3. Az utolsó mechanizmus azon a jelenségen alapszik, hogy a fokális adhézióban résztvevő bizonyos fehérjék (pl. talin (46)) *mechanikai erő hatására konformáció változáson, letekeredésen („force inducible protein unfolding”)* mennek keresztül, ezáltal pedig szabaddá válnak a más fehérjepartnerek kötésére alkalmas doménjeik. Az ezekhez kapcsolódó partnerfehérjék (pl. a talin esetében a vinkulin) ezután aktiválják a jelátviteli kaskád további down-stream komponenseit (pl. a MAPK1-et) (43). Mivel a különböző erősségű mechanikai ingerek hatására az erre specializálódott fehérjék eltérő mértékű „unfoldingon” mehetnek keresztül, tehát különböző új konformációkat vehetnek fel, e mechanizmus a mechanikai ingerek szemikvantitatív érzékelését teszi lehetővé a sejt számára (43). Ilyen módon az említett speciális fehérjék a sejtet érő mechanikai behatások „molekuláris mérőműszereiként” foghatóak fel.

Összegezve elmondható tehát, hogy mind a 3 bemutatott útvonal lényegében a külső erők által kiváltott a fehérjeaktivitás allosztérikjus szabályozása révén valósul meg, abban az értelemben, hogy a fehérjék konformációja mechanikai tényezők hatására megváltozik, ez pedig kihat a biokémiai aktivitásukra (35). Ugyanakkor nyilvánvaló, hogy továbbra is számtalan kérdés vár válaszra, amelyeknek megválaszolása nemcsak az alapvető sejtbiológiai ismereteinket fogja bővíteni, de a betegségek patomechanizmusának megértése, az eredményesebb terápiák fejlesztése és a regeneratív orvostudomány szempontjából is nélkülözhetetlen.

A *kemotaxis* molekuláris hátterét megteremtő szignalizációs folyamatokat a fentiekhez hasonlóan szintén rendkívüli komplexitás jellemzi, amely részben a résztvevő jelátviteli molekulák nagy számából és bonyolult kölcsönhatásaiból adódik, másrészt a redundáns párhuzamos útvonalak működéséből fakad (47). A kemotaxist kísérő intracelluláris biokémiai folyamatok részleteit nagyrészt a *Dictyostelium discoideum* amőba modellen írták le, azonban ez nagyfokú homológiát mutat a soksejtű élőlények sejtjeivel mind az érintett molekulák, mind a köztük kialakuló reakciók tekintetében (48).

A kemotaxis általánosan elfogadott modellje a folyamatot 3 modulra tagolja, amelyek azonban a valóságban nem mindig különíthetőek el élesen, emellett egymástól függetlenül is lejátszódhatnak (49). Az alábbiakban reprezentatív példaként, a *D. discoideum* c-AMP attraktáns stiumlációjára adott kemotaktikus válaszában keresztül ismertetjük a folyamat molekuláris hátterét (48).

1. *A gradiens irányának érzékelése* („directional sensing”) során a sejt felszínén egyenletesen elhelyezkedő, kemotaktikus ligandot kötő receptorok aktivációja a lokális ligand koncentrációval arányos mértékben következik be (50). A bemutatott példa esetében a kemotaxis receptor G-protein kapcsolt receptor, azonban a kemotaktikus ligandok kötését számos egyéb receptor típus is végezheti (pl. receptor tirozin kinázok) (51). Ezt követően a ligand által kiváltott szignalizáció – kevés kivételtől eltekintve –, a másodlagos hírvivők közvetítésével valósul meg. E folyamat legfontosabb lépései: 1) a G-protein aktiválja a Ras G-fehérjét, 2) ez utóbbi aktiválja a foszfatidil-inozitol-3-kinázt (PI3K), aminek révén 3) PIP₂ (foszfatidil-inozitol-3,4,-difoszfát) és PIP₃ (foszfatidil-inozitol-3,4,5-trifoszfát) keletkezik. Ezek azután a „pleckstrin homology” domént tartalmazó fehérjék számára biztosítanak kötési helyeket. Természetesen a G-proteinek

aktivációja egyéb mechanizmusok aktiválódását is kiválthatja, például a foszfolipáz-C enzimét, amely szintén a foszfatidil-inozitol membránlipidekre hat, mivel a PIP₂ lipidet alakítja tovább diacil-glicerin és inozitol-1,4,5-trifoszfát (IP₃) másodlagos hírvivőkké.

2. Az előbbi folyamatban, a PI3K aktivációja nyomán keletkező foszfatidil-inozitol másodlagos hírvivők és a hozzájuk kapcsolódó „pleckstrin homology” domént tartalmazó fehérjék a sejt magasabb kemoattraktáns-koncentráció felé néző, vezető oldalán akkumulálódnak. Emellett egyéb molekulák elhelyezkedése is asszimmetrikussá válik, ezáltal kialakul a sejt *polarizációja*. A sejt poszterior oldalán akkumulálódik a PI3K útvonalat gátló „Phosphatase and tensin homolog” (PTEN) fehérje, valamint a miozin II, amelyek többek között az új állábak kialakulását akadályozzák meg. Emellett a sejt e területeire transzlokálódnak az ERK, MAPK és MEK kinázok is.

3. A sejt *mozgása* végeredményben az által jön létre, hogy a sejt vezető oldalán a megnövekedett F-aktin mikrofilamentumok a plazmamembránra kifejtett nyomása révén sejtkitüremkedés jön létre. E folyamatban a sejtadhéziót biztosító kontaktusoknak, a miozin motoroknak, valamint az aktin elágazások létrejöttét reguláló Arp 2/3 molekula komplexnek is jelentős szerepe van. Ez utóbbi működését pedig a SCAR/WAVE fehérje komplex irányítja. E folyamatokkal párhuzamosan a sejt poszterior végén az adhéziós kontaktusok szétszerelődnek és a sejt visszahúzódik.

Bár a sejtek szolúbilis kémiai gradiens által irányított elmozdulását eredményező biokémiai eseményeket egy konkrét példán keresztül próbáltuk jellemezni, természetesen a kemotaktikus ligandtól függően lehetnek eltérések a folyamat egyes pontjain. Annál is inkább, mivel rendkívül változatos szerkezetű és funkciójú molekulák válhatnak ki kemotaxist. Erőteljes kemotaktikus aktivitásuk alapján elkülöníthetünk ú.n. professzionális kemoattraktáns molekulákat (pl. C5a, kemokinek, hisztamin), amelyek biológiai aktivitásukat a kemotaxis indukciója révén fejtik ki, de még népesebb azon anyagok tábora, amelyeknek a kemotaktikus aktivitás mintegy „mellékes” adottsága. Számos molekulacsalád tagjainál (pl. sók, aminosavak, peptid hormonok) sikerült ilyen irányú aktivitást kimutatni, sőt a környezetvédelem területén, elsősorban a bioremediációra irányuló kísérletek kapcsán bizonyos környezetszennyező anyagokról (pl. nehézfémek, poliaromás szénhidrogének (PAH)) is igazolták, hogy képesek prokarióta vagy eukarióta egysejtűek kemotaktikus válaszát kiváltani (52; 53).

1.2. Gyógyszerhatóanyagok a vízi környezetben

A humán- és állatgyógyászatban alkalmazott gyógyszerhatóanyagok környezetben való előfordulása az 1990-es években került a tudományos érdeklődés középpontjába. Azóta a műszeres analitikai háttér rohamos fejlődésének köszönhetően egyre több adat áll rendelkezésre a gyógyszermolekulák és származékaik földrajzi előfordulásáról, valamint a környezeti koncentrációikról. A vizekben detektálható szint tipikusan a ng/l - $\mu g/l$ –es koncentrációtartományba esik, ami alapján e vegyületek a mikroszennyezők csoportjába, azon belül is a „feltörekvő szennyezőanyagok” (emerging contaminants) közé sorolhatóak. *Mikroszennyezőknek* az igen kis koncentrációban (< part per million vagy ppm) detektálható anyagokat tekintik, legismertebb ilyen komponensek pl. egyes nehézfémek, növényvédő szerek, stb. A „feltörekvő szennyezőanyagokra” emellett még az is jellemző, hogy mivel detektálásuk csak nemrég vált lehetővé, egyelőre kevés a szabványosított és általánosan elfogadott módszer a kvantifikálásukra. Ennek oka, hogy általában technikai nehézséget jelent mind analitikai meghatározásuk, mind eltávolításuk során, hogy viszonylag poláros vegyületek, amelyek gyakran tartalmaznak savas, vagy bázikus funkciós csoportot (54).

Mindezek mellett esetleges ökotoxikológiai hatásaik is kevésbé ismertek, különös tekintettel a krónikus hatásokra. A gyógyszerhatóanyagok lehetséges környezeti kockázatának megállapítása általában a *Predicted Environmental Concentration* (PEC) („előre jelezhető környezeti koncentráció”) és a *Predicted No Effect Concentration* (PNEC) („becsült hatásmentes koncentráció”) összehasonlításával történik (55). Az előbbi adat még becsülhető az adott hatóanyag gyártására és felhasználására jellemző mennyiségekből, valamint a befogadó környezet jellemzőiből; az utóbbi viszont csak kísérletesen határozható meg. A hozzáférhető adatbázisokban azonban a forgalomban levő gyógyszerhatóanyagok csak kb. 1%-nak érhető el ez az adata (56). Kísérleti adatok hiányában szokás az ú.n. *Quantitative Structure-Activity Relationship* (QSAR) (kvantitatív szerkezet-aktivitás összefüggés) megközelítést is alkalmazni. Ennek lényege, hogy a vegyületek fizikai-kémiai tulajdonságai és a biológiai aktivitása között kvantitatív összefüggést állítanak fel, amely lehetővé teszi, hogy az adott fizikai-kémiai paraméterek értékei alapján hasonló szerkezetű molekulák biológiai aktivitását is megjósolják. Ugyanakkor ez a kockázatelemzésben gyakran használt megközelítés a gyógyszerhatóanyagok ökotoxikológiai kockázatelemzéséhez nem mindig eléggé alapos

és pontos (56). Például fajok közötti összehasonlító vizsgálatok eredményei alapján az adott molekula felvétele és hatásmódja fajspecifikus lehet (57). Ebből adódóan a szennyezőanyagok megengedhető környezeti koncentrációira nézve egyelőre nem létezik egységes törvényi szabályozás pl. az Európai Unióban (58). Sőt az új hatóanyagok forgalomba hozatalának engedélyezését megelőző, kötelező környezeti kockázatelemzés esetleges negatív eredménye sem feltétlenül vonja maga után a forgalomba hozatali engedély megtagadását (59).

1.2.1. Gyógyszerhatóanyagok bekerülése és sorsa a környezetben

A humán- és állatgyógyászatban használt gyógyszerhatóanyagok alapvetően előállításuk, vagy felhasználásuk kapcsán kerülhetnek ki a környezetbe. A környezetterhelés túlnyomó része egyértelműen a szervezetből távozó módosítatlan vagy transzformált hatóanyag-származékok révén alakul ki. Az adott hatóanyag farmakokinetikai paramétereitől függően a szervezetből eltérő arányban ürülhetnek a kiindulási vegyület és annak biológiailag aktív vagy inaktív metabolitjai (60). A legtöbb hatóanyag esetében egyébként a kiválasztás túlnyomó részben a vizeleten keresztül valósul meg (60). A transzformált termékek pedig általában glükuronidált származékok, amelyeket a szennyvíztisztító telepek mikrobiális faunája könnyen hasíthat, evvel ismét felszabadítva a kiindulási vegyületet (61).

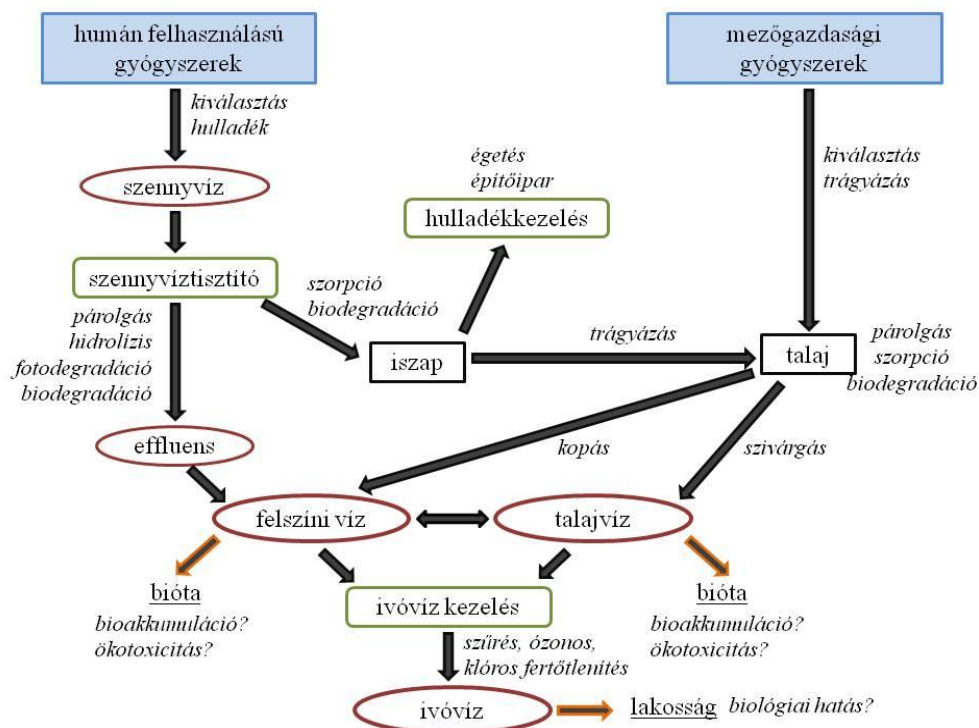
Míg a humán gyógyászatban alkalmazott szerek a közvetlenül a csatornahálózatba, vagyis a szennyvízbe kerülnek, addig az állatorvosi felhasználású hatóanyagok termékei a trágyázás révén vagy az eső közvetítésével a felszíni vizekbe, ill. a talajba, onnan pedig a talajvízbe juthatnak (58). A hatóanyagok alkalmazása során a fel nem használt orvosságok szemétként történő elhelyezéséből vagy csatornahálózatba juttatásából adódó környezetterhelés elhanyagolhatónak tűnik (61). Ugyanígy elenyésző a gyártás kapcsán megvalósuló kibocsátás, mivel manapság, különösen a fejlett ipari országokban, a termelés során keletkező hulladékok ártalmatlanítása és elhelyezése, beleértve az ipari szennyvizek kezelését, szigorú törvényi szabályozás és ellenőrzés alatt áll (56).

A felszíni vizek további szennyezéséhez hozzájárulnak a szennyvíztisztítókról érkező effluensek, mivel sok esetben a hatóanyagok eltávolítása, lebontása csak részben valósul meg a szennyvíztisztító telepeken (62; 63). Az eltávolítás hatásfoka elsősorban a szennyvíz összetételétől, az időjárási viszonyoktól és a kezelési eljárás típusától és a

jellemző műszaki paraméterektől függ (64). Az eliminációnak egyébként mind fizikai-kémiai, mind biokémiai útvai lehetőségek. Ilyenek a „hagyományos” (eleveniszapos) biológiai szennyvíz tisztítás esetében:

- i) a *párolgás*, ami csak az illékony szennyezőanyagoknál jelentős;
- ii) a *photodegradáció*, aminek hatékonysága a molekula fényérzékenységtől, elnyelési spektrumától, a fényintenzitástól, a megvilágítás idejétől függ, ill. esetleges fotoszenzitiváló ágensek jelenlététől;
- iii) a *szorpció*, ami a molekula iszapfázisba történő átkerülését eredményezi és elsősorban az anyag szerves/szerveetlen fázis közötti megoszlási hányadosától függ;
- iv) az *aerob vagy anaerob degradáció*, ami több működési paraméterrel pl. az iszappal és hidraulikus retenciós idővel függ össze (65).

Az ilyen módon a felszíni vizekbe került perzisztens hatóanyagok ellenállhatnak az ivóvíz előállítás során alkalmazott szűrésnek, klóros, vagy ózonos fertőtlenítésnek is, ezáltal bekerülhetnek ez emberi fogyasztásra szánt vizekbe. Jóllehet itt igen alacsony koncentrációban vannak jelen, mégis potenciális közegészségügyi problémát jelenthetnek, hiszen az ivóvíz révén hosszantartó expozíció valósulhat meg (66). A gyógyszerhatóanyagok környezetbe történő bejutásának lehetséges útjait és a különböző kompartmentek közötti vándorlását egyszerűsítve a 2. ábra foglalja össze.

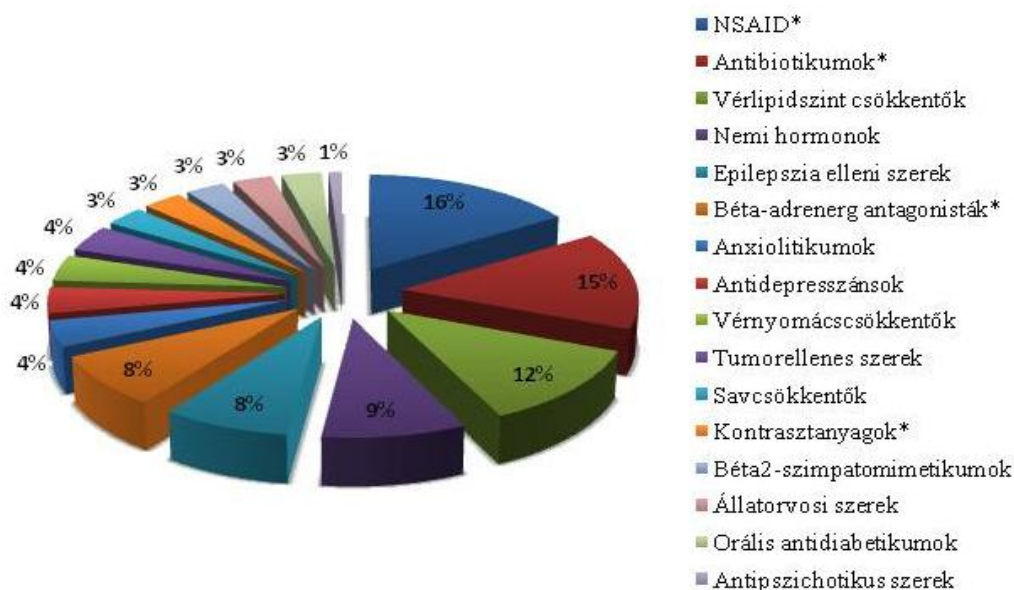


2. ábra: A gyógyszerek bekerülési útjai és sorsa a vízi környezetben (58; 66) alapján

1.2.2. A vizsgált hatóanyagok előfordulása a környezetben

Környezetvédelmi szempontból azok a gyógyszerhatóanyagok lehetnek relevánsak, amelyeket nagy mennyiségben állítanak elő (pl. diklofenák), vagy nehezen bomlanak le a környezetben (pl. jódozott kontrasztanyagok), vagy kis koncentrációban is jelentős a biológiai hatásuk (pl. etinilösztadiol), esetleg ezek közül több feltétel is teljesül egyszerre (56).

A vízi környezetben megtalálható gyógyszerek minősége és mennyisége országoként és vizenként erősen változó lehet. A szakirodalomban bőségesen rendelkezésre álló adatok alapján azonban a leggyakrabban detektált molekulacsaládok a nemszteroid alapú gyulladáscsökkentők (NSAID-k), az antibiotikumok és a vérlipidszint szabályozó szerek (3. ábra). Valamivel ritkábban fordulnak elő, de szintén általánosan jelen vannak a vízi környezetben a szex hormonok, a β -adrenerg antagonisták, anxiolitikumok, ill. egyéb hatóanyag csoportok.



3. ábra: Különböző terápiás szerek detektálásának relatív gyakorisága a világon 1997 és 2009 között (59); *: az értekezésben vizsgált molekula családok

A leggyakrabban detektált molekulákat az alábbi felsorolás foglalja össze, amelyben aláhúzás emeli ki az értekezésben tárgyalt hatóanyagokat:

- i) NSAID: diklofenák, ibuprofen, naproxen, ketoprofen, acetilszalicilsav (67)
- ii) analgetikumok: paracetamol (68)

- iii) antibiotikum: makrolidok (pl. eritromicin, claritromicin), szulfonamidok (pl. szulfametoxazol, szulfaszalazin) (69), bakteriosztatikumok: trimetoprim (68) linkozamid: linkomicin ;
- iv) β -adrenerg antagonisták: propranolol, metoprolol, timolol, atenolol (56);
- v) jó d tartalmú kontraszt anyagok: Na-diatrizoát, iopromid, iopamidol (56).

A környezeti és klinikai/népegészségügyi relevanciájuk, valamint elérhetőségük alapján kiválasztott, vizsgált hatóanyagok pontos molekuláris hatásmechanizmusát, valamint vízi környezetben tapasztalható koncentrációit az 5. táblázat foglalja össze.

5. táblázat: Az értekezésben vizsgált hatóanyagok molekuláris célpontjai és vízi környezetben detektált koncentrációi

Hatóanyag	Molekuláris hatásmechanizmus (70)	Elfolyó szennyvíz (ng/l)	Felszíni víz (ng/l)
acetilszalicilsav	nem szelektív ciklooxygenáz-2 (COX-2) gátlás	150 ⁽⁵⁶⁾	200 ⁽⁵⁶⁾
diklofenák		2 - 3 ^{*(71)}	20 - 931 ^{*(71)}
fenoprofén		300 ⁽⁵⁶⁾	80-120 ⁽⁵⁶⁾
ibuprofén		0,6 ^{*(71)}	4 - 110 ^{*(71)}
naproxén		0,2 - 1 ^{*(71)}	6 - 75 ^{*(71)}
paracetamol	valószínűleg COX-3 gátlás	<LOQ ^{** (71)}	12-777 ⁽⁷²⁾
eritromicin	prokarióta transzláció gátlása az 50S RNS-en	200 ⁽⁷³⁾	4,5 ⁽⁷⁴⁾
linkomicin		24 ⁽⁷⁴⁾	24-60 ⁽⁵⁹⁾
szulfametoxazol	bakteriális folsav szintézis gátlás	91-794 ⁽⁷²⁾	4 ⁽⁷²⁾
trimetoprim		99-1264 ⁽⁷²⁾	78,2 ⁽⁷²⁾
metoprolol	szelektív β 1-adrenerg receptor antagonist	2 - 5 ^{*(71)}	30 ⁽⁵⁶⁾
proranolol	nem szelektív β -blokkoló	30-44 ⁽⁷²⁾	20 ⁽⁷²⁾
timolol	nem szelektív β -blokkoló	5,5 ⁽⁷⁵⁾	n.a.
Na-diatrizoát	-	250 ⁽⁵⁹⁾	2000 ⁽⁵⁹⁾

*Magyarországon mért adat

**LOQ: kvantifikálási határ

A fenti adatok alapján egyértelmű, hogy a legtöbb hatóanyag eltávolítása a konvencionális biológiai szennyvízkezelés során csupán részleges; a teljes elimináció eléréséhez egy vagy több kiegészítő eljárás szükséges (66).

1.2.3. Technológiák a vizeket szennyező gyógyszerek eltávolítására

A biológiai lebontással szemben ellenálló, ú.n. biorecalcitráns szennyező gyógyszerek eliminációjának hatékonyság növelésére több technológia is létezik. Ezek eredményességét legfőképpen az adott vegyület fizikai-kémiai paraméterei határozzák meg (pl. molekulaméret, polaritás, töltés stb.). A jelenleg legintenzívebben kutatott műveletek:

- i) a membránműveletek: reverz ozmózis, nanoszűrés és membrán bioreaktorok (66);
- ii) az aktívszenes adszorpció (66);
- iii) a nagyhatékonyságú oxidációs eljárások (AOP-k): fotolízis, ozonizálás, fenton-reakció, fotokatalízis, elektrokémiai oxidáció és szubkritikus nedves oxidáció (68).

Jóllehet valamennyi eljárás esetében beszámoltak ígéretes eredményekről, az ipari léptékű alkalmazás szempontjából kedvezőtlen a membránműveletek és az aktívszenes adszorpció magas anyag- és energiaige (76). Emellett ezek a módszerek csak a kevés szennyeződést tartalmazó vizek tisztítására alkalmasak és a hulladékok, pl. a szennyezőanyagokban feldúsult retentát, vagy a használt szén megfelelő elhelyezését is biztosítani kell. E hátulütők az AOP-k használatával elkerülhetőek.

Bár az AOP-k csoportjába számos műszaki szempontból igen eltérő technológia tartozik, mindegyik módszer alapja a szennyezőanyagok vizes fázisban történő oxidációja valamilyen reaktív oxidáló ágens (leggyakrabban hidroxil gyökök (OH^{*})) közvetítésével (68). A különböző típusú AOP-k többnyire képesek a szennyező gyógyszerhatóanyagok teljes lebontására és a technológiák változatosságának köszönhetően a szennyvíztisztításon túl is széles a felhasználási spektrumok (pl. szennyvíziszap-kezelés, talajremediáció) (68). Az egyik ilyen ígéretes, szintén széles változatos felhasználási lehetőségekkel kecsegtető módszer például a vákuum-UV (VUV) fotolízis (77).

Az értekezésben vizsgált gyógyszerhatóanyagok lebontása, a Na-diatrizoát kivételével, szintén hatékonyan megvalósíthatóak a különböző AOP-k segítségével, a megfelelő technológia és működési paraméterek megválasztása mellett (6. táblázat). A Na-diatrozoát több oxidálószerrel (pl. O₃, OH^{*}) szembeni rezisztenciáját a molekula

anionos és triszubsztituált voltával magyarázza az irodalom (76). Az előbb említett optimizálható műszaki paraméterek (pl. fényerősség, oxidálószer koncentráció stb.) száma az AOP-k esetében viszonylag jelentős, ami miatt a módszerek beállítása időigényes (66). Ugyanakkor, ahogy azt az alábbi adatok is jelzik, a szennyezőanyagok teljes degradációja nem szükségszerűen eredményezi azok teljes mineralizációját, ami a szerves anyagok egyszerűbb, szervesetlen vegyületekké történő átalakulását jelenti.

6. táblázat: Példák az értekezésben tárgyalt hatóanyagok AOP-k segítségével történő sikeres eltávolítására

Molekula	Mátrix	Oxidáló ágens	Eltávolítási hatások (%)
acetilszalícilsav	n.a.	n.a.	n.a.
diklofenák	dH ₂ O*	UV/H ₂ O ₂	95 %; 40 % mineralizáció ⁽⁷⁸⁾
fenopropfen	ddH ₂ O	O ₃ /UV/TiO ₂	1 h kezelés után 100 % ⁽⁷⁹⁾
ibuprofen	felszíni víz	UV	< 30 % ⁽⁷²⁾
naproxén	dH ₂ O felszíni víz	UV/H ₂ O ₂	100 %; kinetika a felszíni vízben lassabb ⁽⁸⁰⁾
paracetamol	dH ₂ O	UV/H ₂ O ₂	100; 40 % mineralizáció ⁽⁸¹⁾
eritromicin		UV-A/TiO ₂	100%; 100 % mineralizáció ⁽⁸²⁾
linkomicin	dH ₂ O	O ₃	1 h kezelés után csökkent toxicitás ⁽⁸³⁾
szulfametoxazol	dH ₂ O	O ₃ /UV-A/TiO ₂	5 perc után 100 %; 100 % mineralizáció ⁽⁸⁴⁾
trimetoprim	ioncserélt víz folyóvíz	O ₃	95 % ⁽⁸⁵⁾
metoprolol	elfolyó szennyvíz	reverz ozmózis,	100 %; mineralizációról n. a. ⁽⁸⁶⁾
proranolol		O ₃	
timolol			
Na-diatrizoát	elfolyó szennyvíz	O ₃ /UV	36 % ⁽⁸⁷⁾

Az szennyező gyógyszerhatóanyagok AOP-kal történő eltávolítását kísérő legjelentősebb probléma az, hogy kevés kivételtől eltekintve a legtöbb gyógyszer-molekulánál a nagyszámú lehetséges kémiai reakció miatt, nem ismert a

pontos reakciósor. Ezáltal a keletkező termékek szerkezete és mennyisége is ismeretlen. Ennek elsősorban a szükséges analitikai referenciaanyagok hiánya az oka, amelyek általában egyáltalán nem érhetőek el kereskedelmi forgalomban (88). Csupán az AOP-k segítségével leggyakrabban bontott hatóanyagok (diklofenák, karbamezepin, klofibrin sav, szulfametoxazol és a 17 β -ösztradiol) estében állnak rendelkezésre adott módszerekhez társított feltételezett reakcióutak (66). Evvel párhuzamosan a bontás során keletkező degradációs termékek biológiai lebonthatósága, ill. biológiai aktivitása szintén ismeretlen (89). Ráadásul a keletkező bomlástermék-elegyek toxicitásának elemzése kapcsán több hatóanyagnál (pl. diklofenák) is beszámoltak a kiindulási vegyületéhez képest jelentős mértékben fokozott toxicitásról (88).

1.2.4. Gyógyszerek ökotoxikológiai értékelésére használt biológiai tesztek

A gyógyszerhatóanyagok rendeltetésüknél fogva biológiailag aktív szerek, amelyek a környezetbe kerülve a molekuláris célpontjukhoz hasonló biomolekulákat (pl. receptor, enzim stb.) tartalmazó, egyébként nem célorganizmusokra, fajokra is hathatnak (56). Ez teszi szükségessé biológiai, élettani hatásaik vizsgálatát a molekuláris szerveződési szinttől az egyeden át a populáció szintjéig. Emellett a biológiai rendszereken végzett vizsgálatok (bioassay) számos olyan tényezőt is figyelembe vesznek, amelyekről a műszeres analitikai mérések nem képesek információt szolgáltatni. Ilyenek például az adott szennyezőanyag összkoncentrációján belül a biológiailag hozzáférhető rész aránya, egy anyag eltérő töltésű ionjainak aránya, vagy a komplex keverék formájában jelenlevő szennyezőanyagok közötti interakciók (90).

A rutinszerűen alkalmazott, illetve fejlesztés alatt álló biológiai tesztek tárháza rendkívül gazdag (7. táblázat). A különböző típusú vizsgálatok természetesen más-más információt szolgáltatnak, ezért a szennyezőanyagok, így a gyógyszer hatóanyagok ökotoxicitásának megítélése is csak több módszer együttes alkalmazása, illetve minél több faj egyidejű vizsgálata mellett lehetséges.

Az *immunoassay* kitek az igen specifikus antigén-antitest kölcsönhatás révén az adott szennyezőanyag szelektív izolálását és érzékeny mennyiségi meghatározását teszik lehetővé (90). Deng és munkatársai pl. sikeresen mérték indirekt kompetitív ELISA segítségével csap-, felszíni- és szennyvíz minták diklofenák tartalmát a >6 ng/l –es koncentrációtartományban (91).

A *bioszenzorok* integrált biológiai felismerő egységből és fizikai-kémiai (pl. optikai, elektrokémia, stb.) elven működő jeltovábbító részből felépülő eszközök. A biológiai felismerő komponensből (pl. DNS, enzim, antitest, receptor) függően specifikusak lehetnek egy adott molekulára (analitra), vagy molekulacsaládra. Például a ciklooxygenáz (COX) enzim alapú bioszenzorokkal az NSAID-k detektálhatóak (92). Prokarióta és eukarióta sejteket, sejtvonalakat használva viszont komplex keverékeket tartalmazó minták globális toxikus hatása is mérhető. A bioszenzorok egy viszonylag új, igen érzékeny csoportját jelentik az *impedimetriás jeltovábbítást alkalmazó* technikák (93). A sejtadhézió valós idejű követésén alapuló bioszenzorokat sikeresen alkalmazták referencia szennyezőanyagokat tartalmazó ivóvíz minták gyors, helyszíni tesztelésére. Mind a borjú tüdő eredetű endotél sejtvonalak (BPAEC és BLMVEC), mind a változó testhőmérsékletű szivárványos pisztráng kopoltyújából létrehozott RTgill-W1 sejtvonal sejtszelei 1 órán belül adhéziócsökkenéssel reagáltak a toxikus expozícióra (94; 95). Ráadásul a változó testhőmérsékletű (*poikilotherm*) halból származó sejtek 4°C-on akár 78 héten át élet- és válaszképesek maradtak az elektródok felszínén (94). Ugyanakkor az említett két tanulmányban a referenciaanyagok oldószerek, peszticidek és egyéb vegyületek voltak; környezeti szennyező gyógyszerhatóanyagok impedimetria/adhézió alapú detektálásáról az irodalomban egyelőre nincsenek adatok.

A *biomarkerek* jelzőmolekulák, amelyek a környezeti szennyezők hatására jelennek meg a szervezetben molekuláris vagy sejt szintű válaszként. Mennyiségük sokszor korrelál az induktor koncentrációjával, így alkalmasak lehetnek a xenobiotikum mennyiségi meghatározására (90). Ugyanakkor a biomarker megközelítés feltételezi a szennyezőanyag által beindított jelátviteli útvonalak és celluláris védelmi mechanizmusok pontos ismeretét:

- i) az *expozíciós biomarkerek* („*biomarkers of exposure*”) általában olyan a toxikus szer által indukált fehérjék, amelyek védik a sejteket a károsodástól. Többek között ilyenek a hősokk fehérjék (HSP), egyes membrántranszport fehérjék, valamint a méregtelenítésben fontos citokróm-P450 és glutation-S-transzferáz (96). Például ez utóbbiról a vándorkagyló (*Dreissena polymorpha*) hemocitáiban kimutatták, hogy már 5-10 nM paracetamol expozíció hatására szintje jelentősen növekedett (97).
- ii) a *hatást jellemző biomarkerek* („*biomarkers of effect*”) többnyire olyan biomolekulák, sejtalkotók, amelyek tükrözik a sejt élettani egyensúlyának, folyamatainak expozíció

hatására bekövetkező zavarát. Ilyen többek között a xenobiotikumok felvételében és akkumulációjában jelentős szerepet játszó lizoszómák méretének, számának, membránstabilitásának megváltozása. Például ugyancsak a vándorkagyló hemocitáiban a paracetamol hatására a lizoszóma membránok destabilizációja is megfigyelhető volt (97). Emellett ide tartozik még a hím halakban az endokrin rendszert megzavaró ágensek „*endocrin disruptor* (ED)” hatására indukálódó vitellogenin fehérje is (90).

iii) a *fogékonyt jelző biomarkerek* (biomarkers of susceptibility) az élőlény azon veleszületett vagy szerzett képességét jelzik, hogy képes reagálni az adott toxikus expozíció okozta stresszre. Elsősorban genetikai tényezők és bizonyos receptorok tartoznak ide.

Az *egész élőlényeket felhasználó ún. whole-organism bioassayek* szolgáltatják ökológiai szempontból a legrelevánsabb eredményeket, hiszen a megfigyelt toxikus hatás tükrözi a szennyező komponensek biológiai hozzáférhetőségét, farmakokinetikai sajátosságait. Ugyanakkor az ökotoxikológailag reprezentatív eredmény érdekében lehetőség szerint a tápláléklánc valamennyi trofikus szintjéről be kell fajokat vonni az értékelésbe, hiszen jelentős különbség lehet az egyes fajok érzékenysége között (98). Főleg a magasabb rendű organizmusoknál azonban e tesztek nehezen standardizálhatóak és nagy eltérések lehetnek az egyedi érzékenységben is. Emellett a nagyobb testű állatok fenntartása hely és költség igényes.

A teljes élőlényeket felhasználó biotesztek speciális esetét jelentik a *viselkedési assayek*, amelyek információtartalmukban átmenetet képeznek a gyors, de alacsony ökológiai relevanciájú molekuláris tesztek és a lassú, de releváns populáció szintű ökológiai vizsgálatok között (99). Ezáltal lehetővé teszik az akut szubletális biológiai hatások gyors érzékelését, ráadásul a viselkedési paraméterek érzékenysége 1-2 nagyságrenddel jobb a túlélési paraméterekhez képest (99; 100). Manapság már olyan rendszerek is elérhetőek kereskedelmi forgalomban, amelyek egyszerre több faj viselkedésének megfigyelését teszik lehetővé (pl. bbe Fish and Daphnia Toximeter (bbe Moldaenke, Kiel-Kronshagen). A megfigyelt paraméterek leggyakrabban a mozgási viselkedéshez köthetőek, pl. a mozgás sebessége, mintázata, a populáció egyedeinek távolsága, de szokás még a metabolikus aktivitáshoz, táplálkozáshoz (pl. légzési sebesség) köthető válaszokat is vizsgálni.

7. Táblázat: Ökotoxikológiai ill. vízminőség monitorozási célra használt bioassay-k és legelterjedtebb tesztorganizmusok áttekintése

Szint	Módszer	Alapelv	Tesztmolekula, organizmus	Mért paraméter	Eredmény
molekuláris	immunoassay	antigén-antitest kölcsönhatás	antitest	antitest jelölésétől függ	szennyező C _{össz}
	bioszenzor	integrált biológiai jelfelismerés és fizikai-kémiai jeltovábbítás	DNS, receptor, enzim	jeltovábbítástól függ	szennyező C _{össz} C _{hozzáférhető}
egész sejt	bioszenzor	integrált biológiai jelfelismerés és fizikai-kémiai jeltovábbítás	<ul style="list-style-type: none"> • prokarióta: pl. <i>E. coli</i> • eukarióta: pl. <i>S. cerevisiae</i> • sejtvonalak 	jeltovábbítástól függ	genotoxicitás citotoxicitás
	biomarker	xenobiotikum expozíció hatására a sejtben megjelenő jelző molekulák	<ul style="list-style-type: none"> • eukarióta sejt • primer sejtek, sejtvonalak 	általában fehérje pl. enzim, receptor	szennyező C _{hozzáférhető}
	<i>in vitro</i> tesztek	általában biokémiai	<ul style="list-style-type: none"> • baktérium: <i>V. fischeri</i>, <i>E. coli</i> • alga: <i>P. subcapitata</i> • protozoon: <i>Tetrahymena spp.</i> • sejtvonalak 	<ul style="list-style-type: none"> • szaporodás • metabolikus aktivitás • enzim aktivitás • mozgási viselkedés 	akut toxicitás
egész élőlény	korai figyelmeztető rendszerek	valós idejű detektálást lehetővé tevő, viselkedési válaszon alapuló bioassay	<ul style="list-style-type: none"> • féreg: <i>C. elegans</i> • puhatestű: <i>D. polymorpha</i> • ízeltlábú: <i>D. magna</i> • hal: <i>Z. danio</i>, <i>O. mykiss</i> 	viselkedés pl. mozgási, táplálkozási	akut toxicitás
	<i>in vivo</i> tesztek	teljes élőlény szennyezőanyag jelenlétére adott válasza	<ul style="list-style-type: none"> • féreg: <i>C. elegans</i> • puhatestű: <i>D. polymorpha</i> • ízeltlábú: <i>D. magna</i> • hal: <i>Z. danio</i>, <i>O. mykiss</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • szaporodás • embrionális fejlődés • letalitás 	krónikus toxicitás

A viselkedési vizsgálatok egyúttal alkalmasak *korai figyelmeztető rendszereknek*, azaz lehetővé teszik a szennyezőanyagok széles skálája által kiváltott korai, szubletális hatások azonnali, on-line és akár teljesen automatizált vizsgálatát.

1.2.5. Környezetszennyező gyógyszerek ökototoxicitás predikciójának nehézségei

Mivel, ahogy azt már említettük, a gyógyszerek ökotoxikológiai hatására vonatkozóan csupán a molekulák <1%-nál áll rendelkezésre kísérletes adat, igen nagy jelentősége van a toxicitás fizikai-kémiai jellemzők alapján, QSAR-összefüggések segítségével történő becslésének. E megközelítést elméletben lehetővé teszi, hogy a megfelelő fizikai-kémiai paraméterek (pl. megoszlási hányados, pKa) értékeinek ismeretében a különböző vegyületek biológiai hatásmódját és karakterisztikus effektív koncentrációit (pl. EC₅₀) prediktálják.

Ezen prediktív elemzések a szerves vegyületeket négy alapvető hatásmódú osztályba sorolják: az aspecifikus hatású i) apoláros és ii) poláros narkotikumok csoportjába, iii) a reaktív vegyületek és végül iv) a specifikusan ható kemikáliák csoportjába. Az első osztály tagjai biológiai hatásukat teljesen aspecifikus módon fejtik ki, így toxicitásuk szinte kizárólag a szerves és a vizes fázis közötti megoszlási hányadosuktól (logK_{o/w}) függ. Ez egyúttal azt is jelenti, hogy QSAR-elemzés segítségével valamennyi vegyület alap toxicitása („baseline toxicity”) meghatározható a megoszlási hányados ismeretében (101). A poláros narkózt előidéző vegyületek hatása szintén aspecifikus, azonban toxicitásuk valamivel (kb. 5-10-szer) jelentősebb, mint az a megoszlási hányadosuk alapján becsülhető, ami feltehetően a bennük található poláros funkciós csoportok jelenlétével magyarázható (102). A reaktív vegyületek toxicitása szintén meghaladja a becsült „baseline” toxicitást (kb. 10-10⁴-szer), aminek oka, hogy e komponensek nem szelektív módon reakciókba lépnek a sejtben található biomolekulákkal (pl. egy adott funkciós csoporttal). Ugyanakkor molekuláris szinten az ide tartozó anyagok e reakciói molekuláris szempontból igen változatosak lehetnek. Végezetül a specifikusan ható molekulák azok, amelyek hatásukat valamilyen receptoron fehérjén keresztül fejtik ki s hatásuk szintén kb. 10-10⁴-szerese a „baseline” toxicitásnak (55).

E látszólag egyszerű besorolás számtalan tisztázásra szoruló kérdést vet fel. Például milyen molekuláris szintű mechanizmusok eredményezik a narkotikus hatást? Általánosan elfogadott, hogy a folyamat a szennyezőanyagok plazmamembránban való

akkumulációja révén, a membránműködés megzavarásán keresztül zajlik (103). Azonban még így is számtalan lehetséges mód képzelhető el: pl. megváltozhat a membrán fluiditása, morfológiája, a lipid komponensek egymással, ill. fehérjékkel való interakciója (104). Sőt Franks és Lieb „baseline” toxicitást mutató komponensek esetében is leírt specifikus, receptorokon keresztül megvalósuló hatásokat (105). Emellett a QSAR-összefüggések megbízhatósága függhet az alkalmazott organizmustól és végponttól. Rudzok és munkatársai pl. 17 xenobiotikumot, köztük a diklofenákot vizsgálva gyenge korrelációt tapasztalt a molekulák megoszlási hányadosa és citotoxikus hatása között a Tetrahymenán, míg a HepG2 sejteken egyáltalán nem sikerült korrelációt kimutatni (106). Az ugyancsak gyógyszerhatóanyag propranolol egy 5 módszerből álló tesztpanelben 4 assay-ben a megoszlási hányadosa alapján becsült toxicitással megegyező erősségű hatást mutatott, azonban az 5. tesztben a vártnál jóval erőteljesebb, specifikus hatásmódra utaló toxicitást fejtett ki (107). Ugyanezen tesztekben az ösztadiol, az ibuprofén és a szulfametoxazol toxikus hatása viszont mindenhol megfelelt a QSAR alapján prediktált intenzitásnak. Ráadásul a gyógyszerek biológiai aktivitásukat sok esetben nem kizárólag egy molekuláris célpontra hatva fejtik ki. Például a metoprolol szelektív β_1 -adrenerg receptor antagonistája és a propranolol nem szelektív β -blokkoló esetében is leírtak adrenoreceptor független hatásmechanizmusokat is (108; 109). E példákából is látszik, hogy a gyógyszerek ökotoxicitásának reális megítélése pusztán a fizikai-kémiai jellemzőkre alapozva számos nehézségbe ütközik. Nem kerülhetők meg tehát teljes egészében az *in vitro* és *in vivo* kísérletek útján szerzett adatok.

Ráadásul a környezeti szennyező gyógyszerhatóanyagok ökotoxikológiai kockázatelemzését rendkívül megnehezíti, hogy a gyógyszerek nem egyedileg, hanem egy komplex keverék tagjaiként vannak jelen a vízi környezetben. Ezáltal egymás hatását módosíthatják: szinergista kölcsönhatások révén fokozhatják vagy antagonisták kölcsönhatás révén csökkenthetik. A kialakuló interakciók lehetnek akár fizikai-kémiai természetűek, amivel pl. egymás oldódását, biológiailag hozzáférhető koncentrációját, vagy farmakokinetikáját befolyásolják, de lehetnek biokémiai jellegűek is, pl. kompetíció a receptorért, enzimért. A keverékek együttes hatásának becslésére használt leggyakoribb matematikai modelleket az alábbi fejezet foglalja össze.

1.2.5.1. A keverékek globális hatásának becslésére alkalmazott modellek

Mivel a környezetben előforduló szennyezőanyag-elegyek összetétele időben és térben jelentősen változhat, sok esetben nem lehetséges a keverékek toxikus hatásának közvetlen mérése. Ha azonban ismertek az egyedi komponensek, jó alternatívát jelenthet az anyagok egyedi toxikus hatása alapján extrapolálni. A keverékek várható toxicitásának predikciójára több koncepció is született, amelyek közül a vízi ökotoxikológia területén főleg két modell terjedt el (103; 110).

A *koncentráció addíciós modell* az azonos hatásmechanizmusú szerek keverékeinek toxikus hatását írja le. Szűkebb értelemben az azonos hatásmechanizmus azonos molekuláris célpontot jelent. Tágabb értelemben viszont jelentheti, hogy két anyag képes ugyanazt a típusú választ eredményezni, pl. a tesztorganizmus halálát. Legegyszerűbb esete, ha a komponensek egymás hígított változatainak tekinthetők és ugyanaz a hatás elérhető az egyik anyagnak – részben vagy egészben – a másikkra történő kicserélésével. Matematikai formalizálása:

$$\sum_{i=1}^n \frac{c_i}{EC_{x_i}} = 1$$

ahol n az elegy összetevőinek száma, EC_{x_i} az i -edik komponens önállóan $x\%$ -os hatást eredményező koncentrációja, c_i pedig ugyanezen komponens elegybeli koncentrációja. Valamennyi c_i/EC_{x_i} hányados az adott komponens keverékbeli relatív toxicitását fejezi ki, ezért toxikus egységnek (TE) is nevezik. Következésképp az elegy komponensei egymással mindaddig szabadon felcserélhetőek az elegy hatásának megváltozása nélkül, amíg a TE-k száma állandó marad (110).

Farmakológiai megalapozottságának köszönhetően, a koncentráció addíciós koncepció a legáltalánosabban elfogadott modell elegyek toxicitásának predikciójára. Például az apoláris narkózis típusú, teljesen nonspecifikus hatásmóddal rendelkező kemikáliák keverékeinek toxicitását jól prediktálta (55). A vízi szennyező gyógyszerek közül pl. a diklofenák és az ibuprofén ilyen apoláris narkotikus hatásmóddal hatott mind a *Daphnia* immobilizációs tesztben, mind a *Desmodesmus* és *Lemna* alga növekedési tesztekben. Továbbá a két hatóanyag keverékei által kiváltott toxicitást valamennyi assay típusban megfelelő pontossággal prediktálta a koncentráció addíciós modell (103). Altenburger és munkatársai 50, szintén narkózis típusú hatásmóddal rendelkező szerves vegyület

keverékeinek toxicitását modellezték QSAR segítségével és azt találták, hogy a koncentráció addíciós modell (kb. 10%-os hiba mellett) megfelelő első közelítést adott a keverékek toxicitásának predikciójára (111).

A keverék komponenseinek független hatásán alapuló *válasz addíciós* koncepció lényegesen kevésbé elterjedt a vízi ökotoxikológiában (112). E modellben az egyes anyagok hatása abban az értelemben független egymástól, hogy a szerek más molekuláris célpontokon, vagy más élettani rendszereken keresztül hatnak az élőlényben. Matematikai formalizálása:

$$E(c_{Mix}) = E(c_1 + \dots + c_N) = 1 - \prod_{i=1}^n [1 - E(c_i)]$$

ahol $E(c_{Mix})$ az n komponensű elegy hatását fejezi ki 0 és 1 között, c_{Mix} a keverék teljes koncentrációja, c_i az i -edik komponens aktuális koncentrációja, $E(c_i)$ pedig az ehhez tartozó egyénileg létrehozott hatás erőssége.

Habár a fenti két koncepció a szennyező anyagok széles körére viszonylag gyors és pontos első közelítést tud adni, bonyolultabb, sok komponenst tartalmazó keverékek esetében a precízebb eredmény érdekében szükség lehet a modellek finomítására vagy alternatív megközelítésekre. Több esetben a koncentráció additív modellhez képesti eltérés viszonylag egyértelmű koncentráció függését írták le. Például a *Tetrahymena thermophila* viabilitását a Cd, Cu és Zn alacsony összkoncentrációjú kétkomponensű keverékei kevésbé csökkentették, mint azt az additív együttes hatás alapján várták. A magas összkoncentrációjú keverékekben azonban az additív együttes hatás alapján vártnál erősebb toxicitást tapasztaltak (113). Hasonló eredményekről számoltak be az NSAID diklofenák, az antibiotikum triklozán és a nikkell keverékeinek citotoxikus hatásaival kapcsolatban, amit a humán hepatóma HepG2 sejtvonalon vizsgáltak. Míg a diklofenák és a triklozán kétkomponensű keverékeiben érvényesült a koncentráció addíció, addig a nikkell jelenlétében alacsony koncentrációkban antagonist, magas koncentrációkban szinergista kölcsönhatás alakult ki (114). Ugyanakkor találunk olyan példákat is az irodalomban, ahol a megfigyelt kölcsönhatás típusok komplex koncentráció függő mintázatot mutattak, amelyet nem lehetett egyszerű és általános érvényű, extrapolációra alkalmas kvantitatív összefüggéssel jellemezni. Ilyen eredményt írtak le pl. 13 környezeti szempontból releváns gyógyszerhatóanyag (pl. ibuprofén, szulfametoxazol, linkomicin stb.) citotoxikus hatását vizsgálva *E. colin*, humán

embrionális (HEK293) sejtvonalon, valamint ösztrogénfüggő tumor (OVCAR3) sejtvonalon. A kapott eredmények azt mutatták, hogy bizonyos esetekben az egyes gyógyszerek egymás hatását szinergista módon erősítették, tehát az egyik gyógyszer a másikra nézve kemoszenzitizálta a modell sejteket. E hatások azonban igen komplex koncentrációfüggést mutattak.

1.3. A vizsgált modell-sejtek főbb jellemzői

Az alábbiakban röviden ismertetjük az általunk vizsgált, a filogenezis különböző szintjeiről származó modellek ökotoxikológia szempontjából legfontosabb jellemzőit.

1.3.1. Tetrahymena pyriformis eukarióta csillós egysejtű

A *T. pyriformis* nem patogén édesvízi csillós egysejtű faj, aminek jelenléte az adott vízi környezet egészséges ökológiai státuszára utal (115). Fontos modellorganizmus egyrészt a molekuláris sejtbiológia, másrészt az ökotoxikológia területén. Ennek oka hogy, számos sejtfiziológiai mechanizmus (pl. jelátviteli útvonalak (116)) és struktúra (pl. receptorok (117)) szempontjából jelentős homológiát mutat a magasabb rendű szervezetek sejtjeivel. Ugyanakkor ökotoxikológiai relevanciájához hozzájárul, hogy az eleveniszapos szennyvíztisztítás mikrobiális faunájának tagja, valamint a szennyezőanyag bioakkumulációjára hajlamos protozoon trofikus szint jelentős képviselője (115). Jóllehet a *T. pyriformis*-on többszáz szerves vegyület (pl. alifás (118) és aromás molekulák (119), nitrobenzol származékok (120), peszticidek (106)) toxikus hatásáról állnak rendelkezésre kísérleti adatok QSAR-elemzés céljából, a környezeti szempontból releváns gyógyszerhatóanyagok közül alig néhányról van e fajon mért eredmény. Az egyik ilyen a diklofenák, amelynek EC_{50} értékét $1,04 \cdot 10^{-2}$ M-nak találták sejtszámlálás alapján és $7,5 \cdot 10^{-3}$ M -nak MTT assayjel (106).

1.3.2. Humán sejtvonalak

A különböző sejtvonalak az élő állatokra kifejtett biológiai hatások predikciója céljából történő toxikológiai és ökotoxikológiai felhasználása az utóbbi években jelentősen megnőtt. Ennek oka, praktikus előnyeik mellett, az a társadalmi igény, hogy az élő állatok ilyen célokra történő felhasználását csökkentsék. A laborállatok etikus felhasználására vonatkozó „3R-elv” értelmében ugyanis a kísérletbe bevont állatok számának csökkentésére („Reduction”), a tesztek finomítására finomítására, azaz minél

kevesebb szenvedés okozására („*Refinement*”) és az élőállatok helyettesítésére („*Replacement*”) kell törekedni (121). A REACH (*Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals*), a kemikáliák értékelésére és engedélyeztetésére vonatkozó európai szabályozás 2007-es bevezetésével különösen megnőtt az utóbbi pont értelmében megvalósítható gazdaságos és etikus *in vitro* toxicitási vizsgálatok iránti igény. Ugyanakkor a vízminőség-monitorozás területén Richardson és munkatársai már 1977-ben emlős sejtvonalakat alkalmaztak olajfinomítók szennyvizeinek vizsgálatára. (122). Azon megfontolás alapján, hogy a xenobiotikumok élőlényekre kifejtett toxikus hatásai elsőként a sejt szintjén jönnek létre, és később nyilvánulnak meg a szerv és a szervezet szintjén, a sejtvonalakon mért toxikus hatásokból extrapolálni lehet a szervezet szintű hatásokra (123).

Az alábbiakban röviden ismertetjük az általunk modellként használt emberi sejtvonalakat.

1. A spontán transzformálódott, normál fenotípusú *HaCaT keratinocita* sejtvonal, a bőr irritáció és bőrrák bevett toxikológiai modellje (124). Emellett széles körben alkalmazott sejttípus a migrációs, pl. sebgyógyulási assayben. Továbbá a durotaxis szempontjából kiemelt jelentőségű, mivel a mechanoreceptorok és a mechanotranszdukcióban résztvevő komponensek szempontjából jól karakterizált (125).
2. A *HepG2 májkarcinóma* eredetű epitél morfológiájú sejtvonal a gyógyszerfejlesztés alatt álló kandidáns molekulák és a környezeti szennyező anyagok (pl. PAH, nehéz fémek) citotoxikus és genotoxikus hatásának tesztelésére széles körben alkalmazott modell (126). Jóllehet a HepG2-tumor eredetű sejt, méregtelenítő enzim expressziója a májéhoz hasonló, a biotranszformáció 1. és 2. fázisában szerepet játszó enzimekkel (pl. CYP1A1 és glutation-S-transzferáz) is rendelkezik (126; 127).
3. Az *MCF7 egy invazív emlő karcinómás* beteg pleuralis folyadékából indított epitél morfológiát mutató sejt, egyben a legrégebbi emlőtumor eredetű sejtvonal (128). Éppen ezért az emlőtumorokról *in vitro* nyert tudományos eredmények nagy része e sejtvonalon született. Mivel az MCF7 sejtek mind progeszteron, mind ösztrogén receptort expresszálnak, továbbá ösztrogén függő a proliferációjuk, alkalmazásuk az ökotoxikológiában elterjedőben van, elsősorban az endokrin perturbátor hatás vizsgálata során (129; 130).

2. Célkitűzések

A migráció alapvető sejtélettani folyamatként kulcsfontosságú szerepet tölt be, mind az egysejtű, mind a soksejtű organizmusok életműködésében. A sejtek különböző stimulusokra (pl. kémiai anyagokra vagy mechanikai ingerekre) adott migrációs válaszána vizsgálata a viselkedési assay-k egy speciális formájának tekinthető. 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 szennyezőanyagok (pl. nehézfémek, szerves molekulák) is modulálni tudják a sejtek mozgását. A különböző szennyezőkkel, főleg baktériumokon és egysejtűeken végzett, elsősorban a bioremediáció lehetőségét vizsgáló ilyen irányú kísérletek (52; 53) igazolták, hogy a migráció egy-két nagyságrenddel érzékenyebb végpont lehet, mint például a sejtek letalitása. E kiemelkedő érzékenység különösen előnyös, mivel az említett szennyező anyagok a környezetben igen *alacsony* (pl. nanomólos) koncentrációban lehetnek jelen.

Fentieket figyelembe véve munkám célja a környezeti szennyező anyagok egy viszonylag új csoportjának, a gyógyszerhatóanyagoknak a filogenezis különböző szintjein található modellsejtek migrációjára kifejtett hatásainak a vizsgálata volt. A csillós egysejtű modell és a humán sejtvonalak érzékenységének összevetésén túlmenően további célom volt az ökotoxikológia területén újnak számító impedimetriás módszerek ilyen irányú alkalmazhatóságának vizsgálata is. Emellett a *Cambridge-i Egyetem Cavendish Laboratóriumában* tett tanulmányutam során végzett durotaxis kísérleteink során elsőként vizsgáltuk, hogy környezetet szennyező anyagok befolyásolják-e a sejtek mechanotaxisának egy speciális formáját, a környezet rigiditása által irányított durotaxis.

Munkám első szakaszában kísérleteimet a *Tetrahymena pyriformis* GL édesvízi eukarióta csillós egysejtűn végeztem. Első lépésben a kozmetikai- és élelmiszeriparban illatanyagként alkalmazott egyszerű szerves kis molekulák sejtbiológiai hatásait tanulmányoztam. Vizsgálataim az alábbi kérdések megválaszolására irányultak:

- ***Különböznek-e a nagy szerkezeti hasonlóságot mutató (konstitúciós izomer) kis 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 (PLC és PI3K) az anyagok által kiváltott kemoattraktáns válaszok mediálásában?*

Ezt követően 14, a vízi környezetben igen gyakran előforduló gyógyszerhatóanyag proliferációra és migrációra gyakorolt hatását tanulmányoztam. A vizsgált hatóanyagcsaládok (nemszteroid gyulladáscsökkentők, antibiotikumok, β -adrenerg antagonisták és jódozott kontrasztanyagok) relevanciájához az is hozzájárul, hogy e csoportok a humán- és az állatgyógyászatban a leggyakoribb és legnagyobb tömegben felhasznált szerek közé tartoznak. Munkám e szakaszában céлом az alábbi kérdések megválaszolása volt:

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

A csillós egysejtűvel végzett kísérleteim lezárásaként a fenti kísérletek során kidolgozott, proliferáció gátlás és kemotaxismérésekből álló, újonnan bevezetett tesztrendszer egy gyakorlati probléma megoldása során 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 záró szakaszában vizsgálataimat 3 humán sejtvonalon végeztem (HaCaT spontán transzformálódott keratinocita, HepG2 hepatocelluláris karcinóma és MCF7 emlőkarcinóma sejtvonalak), amelyek a toxikológiában más-más szervek/funkciók

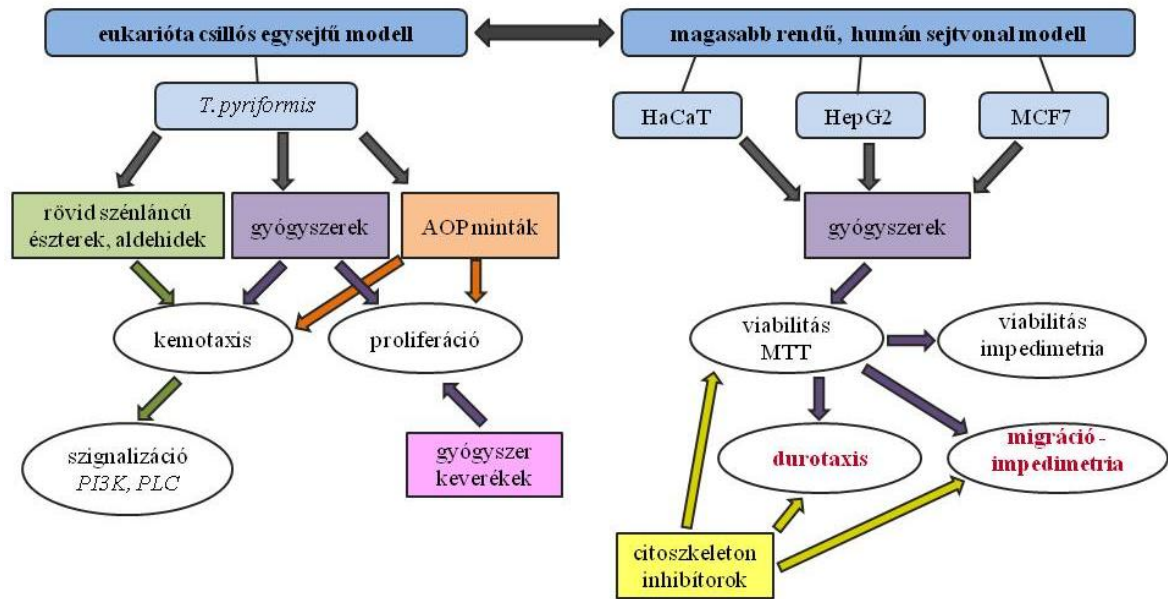
specifikus és validált modelljének számítanak. A fent említett környezeti szennyező hatóanyagok sejtvitalitásra gyakorolt hatását kutató kísérleteim célja az alábbi kérdések megválaszolása volt:

- *Hogyan hat a 14 gyógyszermolekula a sejtek vitalitására? Független-e a citotoxicitási assay érzékenysége az alkalmazott sejtvonalától 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 assayben leghatásosabbnak talált két molekulacsalád, a nemszteroid alapú gyulladáscsökkentők és a β -blokkolók szelektált tagjainak sejtmigrációra kifejtett hatását vizsgáltam. Ennek során két az ökotoxikológiában új, innovatív technika (az impedimetria alapú sebgyógyulási/migrációs assay ill. durotaxis assay) alkalmazhatóságának kérdésével is foglalkoztam. Kísérleteim az alábbi kérdések megválaszolására irányultak:

- *Alkalmazható-e az általam használt 3 sejtvonal az impedimetria alapú migrációs assay-kben folytatott vizsgálatokra?*
- *Befolyásolja-e az MTT módszerrel leghatásosabbnak talált 3 gyógyszermolekula a sejtek migrációját a környezeti szempontból releváns koncentrációban alkalmazva?*
- *Megfigyelhető-e az általam alkalmazott sejtvonalak durotaxisa az erre a célra speciálisan kialakított, rigiditás lépcsőket tartalmazó hidrogél felszíneken?*
- *Képesek-e a kiválasztott gyulladáscsökkentő és β -adrenerg antagonisták a HaCaT és a durotaxis vizsgálatokban referenciának tekintett 3T3 (egér fibroblaszt) sejtek durotaxisát befolyásolni/gátolni?*

Az értekezésemben tárgyalt legfőbb vizsgálatokat a 4. ábra foglalja össze.



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

3. Anyagok és módszerek

3.1. Felhasznált anyagok

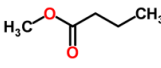
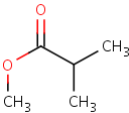
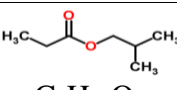
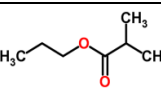
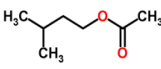
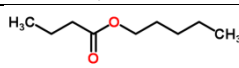
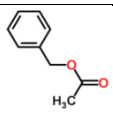
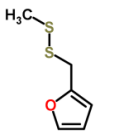

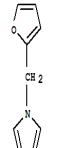
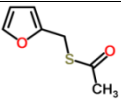
3.1.1. Illatanyagok

A *Tetrahymena* kemotaxisa szempontjából vizsgált, az élelmiszer- és kozmetikai ipar által íz-, ill. illatanyagként használt *rövid szénláncú észterek* előállítására az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoportjában került sor. A 7 vizsgált észter (izobutil-propionát (IBP), propil-izobutirát (PIB), metil-butirát (MB), metil-izobutirát (MIB), pentil-butirát (PB), izoamil-acetát (IAA) és benzil-acetát(BA)) szintézisét a klasszikus Fischer-féle észteresítési reakcióval végeztük (131). A reakció hatásfokának javítása különböző módszerekkel történt: i) a keletkező víz heteroazeotróp desztillációval való eltávolításával, amelynek során az azeotróp elegy másik tagja benzol (IPB, PIB), vagy toluol (PB) volt; ii) az alkohol nagy feleslegben történő alkalmazásával (IAA, MB és MIB); iii) acetyl-klorid és piridin szerves oldószert, ill. bázist használva a naszcens hidrogénklorid semlegesítésére (BA). Az észterek szárítása és tisztítása vízmentes MgSO₄-on, ill. desztillációval történt. A keletkező termékeket gázkromatográfiával, valamint a forráspontjuk (T_f) alapján azonosítottuk. Az egyes észterek szintézisekor felhasznált reagenseket, valamint az észterek forráspontját és megoszlási hányadosát a 8. táblázat foglalja össze. Mivel az észterek szintézise során alkalmazott reagensek nyomnyi mennyiségben való jelenléte, a tisztítás ellenére sem zárható ki, így a kemotaxis szempontjából korábban nem vizsgált oldószerek (8. táblázatban * -gal jelöltek) ilyen irányú aktivitását is meghatároztuk.

A fent említett szerves molekulák mellett, további 4 aromás aldehid a furfuril-merkaptán, furfuril-tioacetát, furfuril-pirrol és metil-furfuril diszulfid (Sigma-Adrich, St. Louis MO, USA) kemotaktikus aktivitását vizsgáltuk. Jellemző fizikai-kémiai paramétereiket a 8. táblázat tünteti fel.

Az anyagok (aldehidek, észterek) hígítására egységesen abszolút etanolban (Molar Chemicals, Budapest) került sor, majd az így kapott 10⁻³ M koncentrációjú törzsoldatokat tápfolyadékban hígítottuk tovább a 10⁻¹²-10⁻⁶ M-os koncentráció tartományban.

8. táblázat: A vizsgált észterek kiindulási anyagai és fizikai-kémiai jellemzői, valamint a 4 aromás aldehid azonos fizikai-kémiai paramétereit

Anyag	Szerkezet	M (g/mol)	logP ₃ [*]	T _f (°C)	Reagens
metil-butirát (MB)	 C ₅ H ₁₀ O ₂	102	1,2	91	vajsav* metanol
metil-izobutirát (MIB)	 C ₅ H ₁₀ O ₂	102	1,3	102-103	izovajsav* metanol
izobutil-propionát (IPB)	 C ₇ H ₁₄ O ₂	130	2,2	136	propionsav* izobutanol benzol
propil-izobutirát (PIB)	 C ₇ H ₁₄ O ₂	130	2,1	134	izovajsav* propanol benzol
izoamil-acetát (IAA)	 C ₇ H ₁₄ O ₂	130	2	132	ecetsav izoamilalkohol
pentil-butirát (PB)	 C ₉ H ₁₈ O ₂	159	2,7	186	vajsav* amil-alkohol* toluol
benzil-acetát (BA)	 C ₉ H ₁₀ O ₂	150	2	206	benzil-alkohol* acetyl-klorid piridin
metil-furfuril-diszulfid	 C ₆ H ₈ OS ₂	160	1,5	n.a.	-
furfuril-merkaptán	 C ₅ H ₆ OS	114	1,3	n.a.	-
furfuril-pirrol	 C ₉ H ₉ NO	147	1,4	n.a.	-
furfuril-tioacetát	 C ₇ H ₈ O ₂ S	156	1,3	n.a.	-

*logP₃: szimulációval számolt oktanol/víz megoszlási hányados; www.pubchem.gov

3.1.2. Gyógyszerhatóanyagok

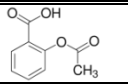
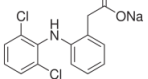
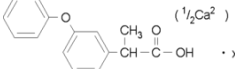
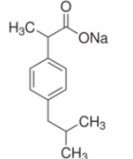
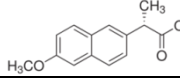
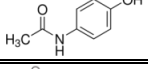
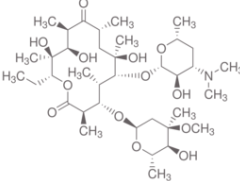
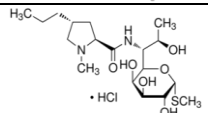
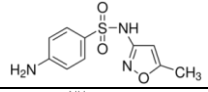
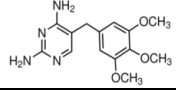
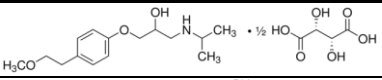
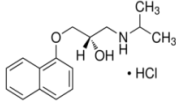
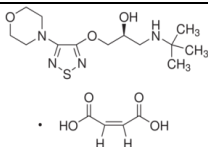
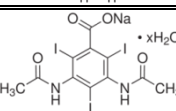
A munkám során vizsgált 14 környezeti szennyező gyógyszerhatóanyagot a Sigma-Aldrich-tól (St. Louis MO, USA) szereztük be analitikai tisztaságú formában. Ezek közül a 8 szobahőmérsékleten vízdoldékony anyag (diklofenák-Na, ibuprofén-Na, naproxén-Na, linkomicin-hidroklorid, metoprolol-tartarát, propranolol-hidroklorid, timolol-maleát és Na-diatrizoát) oldását és hígítását mindig az adott sejtnak megfelelő tápfolyadékban végeztük. A többi 6 anyag (acetilszalicilsav, fenopropfen-Ca, paracetamol, eritromicin, szulfametoxazol, trimetoprim) oldása először dimetilszulfoxidban (DMSO) (Reanal, Budapest) történt, majd a törzsoldatokat (10^{-3} - 10^{-2} M) a megfelelő tápfolyadékban hígítottuk tovább. Ezeknél a szereknél minden vizsgálattípusban a megfelelő DMSO tartalmú tápfolyadékot használtuk negatív kontroll gyanánt. A hatóanyagokra jellemző, a környezeti és az *in vivo* megoszlásuk szempontjából legfőbb fizikai-kémiai paramétereket a 9. táblázat foglalja össze.

A durotaxis vizsgálatok során referenciaként vizsgált, citoskeletonra ható blebbistatin, kalikulin-A, citokalazin-B, citokalazin-D, kolhicin, nokodazol és falloidin beszerzése a Sigma-Adrich-tól (St. Louis MO, USA) történt. Mivel e szerek egyike sem oldódik vízben, a kolhicin kivételével mindegyikből DMSO-ban (Sigma-Adrich, St. Louis MO, USA) készítettünk 10^{-3} - $3 \cdot 10^{-3}$ M-os törzsoldatot, majd azt a megfelelő tápfolyadékban hígítottuk tovább. A kolhicinnel hasonlóan jártunk el, avval a különbséggel, hogy a törzsoldatot ($2 \cdot 10^{-3}$ M) abszolút etanolban (Sigma-Adrich, St. Louis MO,) készítettük. Vizsgálataink során, amennyiben valamelyik oldószer aránya meghaladta az 1 v/v %-ot, úgy azonos szolvens arányú tápfolyadékot használtunk negatív kontroll gyanánt.

3.1.3. Gyógyszerhatóanyag kombinációk

A *Tetrahymena* proliferáció gátlási vizsgálatban az egyéni komponensek toxicitása mellett a 4 leghatásosabbnak talált, vízdoldható szer kétkomponensű keverékeit is vizsgáltuk. Az ezekből képezhető 6 lehetséges elegy mindegyikét előállítottuk, majd 2^4 faktoriális kísérleti elrendezés alapján vizsgáltuk. A 2 vizsgált faktor a kétkomponensű elegy összetevőinek felelt meg. A 4 különböző faktor szint pedig a komponensek egyedi koncentrációjából adódott, amelyeket az 1.2.6.1. pontban ismertetett Toxikus Egység (TE) koncepció alapján határoztuk meg az egyedi koncentráció-hatás görbék ismeretében. Az egyéni koncentrációk így 0,25, 0,5, 0,75 és 1 TE-nek feleltek meg.

9. táblázat: A vizsgált szennyező hatóanyagok szerkezete és fizikai-kémiai paramétere

Hatóanyag	Szerkezet*	M (g/mol)	pK _a **	LogP**	Oldhatóság (mg/ml),
acetilszalicilsav		180	3,5	1,2	1,0
diklofenák-Na		318	4,2	4,4	50
fenoprofén-Ca		522	4,5	3,3	0,08
ibuprofén-Na		228	4,9	3,5	100
naproxén-Na		252	4,2	3,3	> 1000
paracetamol		151	9,4	0,5	12,8
eritromicin		734	8,9	2,7	1,0
linkomicin-hidroklorid		443	7,6	0,2	> 1000
szulfametoxazol		253	1,6 5,7	0,9	0,6
trimetoprim		290	7,1	0,9	0,4
metoprolol-tartarát		684	9,6	1,9	50
propranolol-hidroklorid		296	9,5	3	50
timolol-maleát		432	9,2	1,8	> 1000
Na-diatrizoát		636	1,0	1,8	> 1000

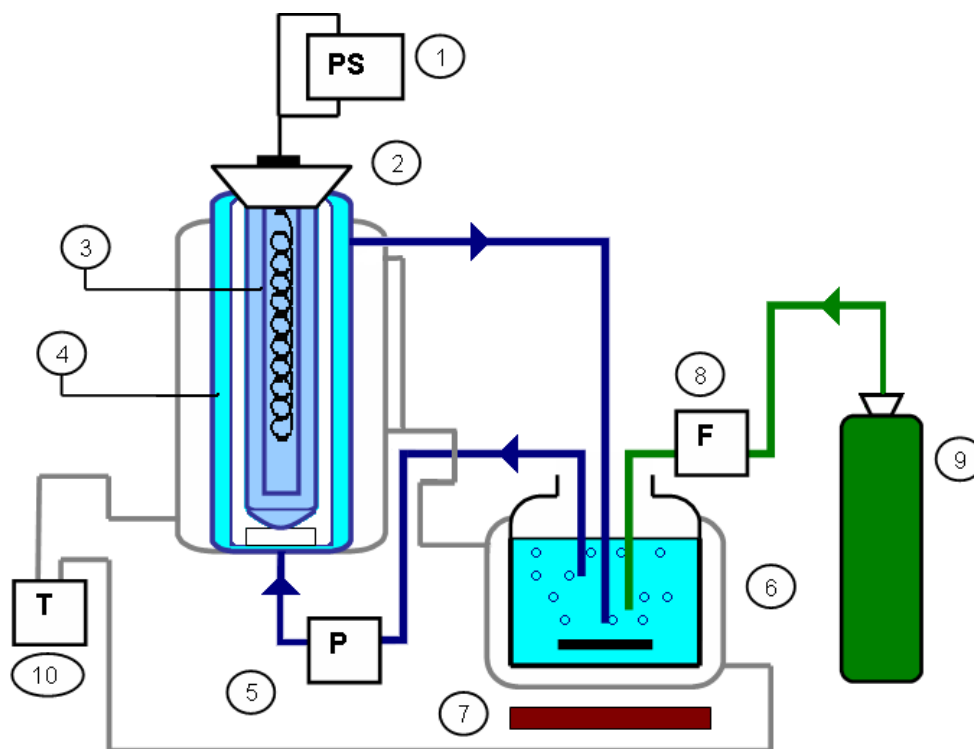
* forrás: www.sigma-aldrich.com

** a nemionos formára vonatkoznak; forrás: www.pubchem.gov

3.1.4. Diklofenák vákuum-UV (VUV) fotolíziséből származó minták

A diklofenák nagy hatékonyságú oxidációs bontását és kémiai analizését a Szegedi Tudomány Egyetem Műszaki és Anyagtudományi Intézetében, valamint a Szeretlen és Analitikai Kémiai Tanszék Környezetkémiai Kutatócsoportjánál végezték. A 10^{-4} M kiindulási koncentrációjú, PBS-ben (pH = 7,4; 1,1 mM NaH_2PO_4 (Spektrum 3D, Debrecen)) oldott diklofenák bontására az 5. ábrán bemutatott vákuum-UV reaktorban került sor O_2 -telített, vagy O_2 -mentes környezetben.

A fotolízis közben megadott időpontokban levett minták pH-ját, teljes szerves széntartalmát (TOC), diklofenák koncentrációját, valamint a keletkező bomlástermékek feltételezett szerkezetét és mennyiségét szintén a Szegedi Tudomány Egyetem fent említett két intézetében határozták meg.



5. ábra: A diklofenák fotolíziséhez használt vákuum-UV reaktor sémája (132). Részek: 1. áramforrás; 2. tömítőgyűrű; 3. xenon gerjesztéses UV lámpa; 4. reaktor; 5. pumpa; 6. tartály; 7. mágneses keverő; 8. áramlásmérő; 9. O_2 , vagy N_2 tartály; 10. termosztát

A különböző időpontokban (0, 10, 20, 40, 90, 150, 300, 600, 900, 1200, 1500, 1800, 2400, 3000 és 3600 s) levett és felhasználásig -4 °C-on tárolt mintákat a proliferáció gátlás méréséhez 1, 5, 25 v/v% arányban hígítottuk a *T. pyriformis* tenyésztéséhez

használt tápfolyadékban. A kemotaxisméréshez a mintákat 10-szeres hígítási lépéseket alkalmazva a 0,00001 és 1 v/v% közötti tartományban vizsgáltuk.

3.2. Modell sejtek és fenntartásuk

3.2.1. *Tetrahymena pyriformis* eukarióta csillós egysejtű

Kísérleteinkhez exponenciális növekedési fázisban levő, 24 órás *Tetrahymena pyriformis* GL csillós tenyészeteket alkalmaztunk, amelyeket 0,1 % élesztőkivonatot (Oxoid, Basingstoke, UK) és 1% Bacto tryptone-t (Difco, Detroit, MI, USA) tartalmazó tápoldatban (pH = 7,4) tenyésztettünk 28°C-on, légköri O₂ és CO₂ tartalom mellett.

3.2.2. *HaCaT* humán keratinocita sejt vonal

A HaCaT keratinociták tenyésztése 10% hőinaktivált borjúsavóval (Lonza, Bazel, Svájc) kiegészített 4,5 g/l glükóz tartalmú DMEM tápfolyadékban történt, amihez a következő kiegészítőket adtuk: 1% nem esszenciális aminosav oldat, 1 nM piruvát, 2mM L-glutamin, 100 IU/ml penicillin és 100 µg/ml sztreptomycin. A tápfolyadék valamennyi összetevőjét a Sigma–Aldrich-tól vásároltuk (St. Louis, MO, USA). A sejtenyészeteket 37°C-on, 5% CO₂ tartalom mellett tartottuk fent. A médiumot 2-3 naponta cseréltük, ill. a 80-90 %-os konfluencia elérésekor a sejteket tripszin-EDTA (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) oldattal passzáltuk és kb. 1:10 arányban új tenyésztőflaskában (Orange Scientific, Braine-l'Alleud, Belgium) vittük tovább.

3.2.3. *HepG2* humán hepatocelluláris karcinóma sejt vonal

A HepG2 sejt vonalat (ATCC HB-8065) 10 % hőinaktivált borjúsavóval, 2 mM L-glutaminnal, 100 IU/ml penicillinnel, valamint 100 µg/ml sztreptomocinnel kiegészített RPMI 1640 (Sigma–Aldrich, St. Luis, MO, USA) médiumban tenyésztettük 37 °C-on, 5%-os CO₂ tartalom mellett. A sejtek passzálását a 3.2.2 pontban leírtak szerint végeztük.

3.2.4. *MCF7* humán emlőkarcinóma sejt vonal

Az MCF7 (ATCC: HTB-22) sejt vonalat 10% hőinaktivált borjúsavóval, 1% nem esszenciális aminosav oldattal, 2 mM L-glutaminnal, 100 IU/ml penicillinnel és 100 µg/ml sztreptomocinnel kiegészített DMEM tápfolyadékban (Sigma-Aldrich, St. Louis,

MO, USA) tartottuk fent 37°C-on, 5% CO₂ tartalom mellett. A sejtek passzálását a 3.2.2 pontban leírtak szerint végeztük.

3.2.5. 3T3 egér fibroblaszt sejt vonal

A durotaxis vizsgálatok során referenciaként alkalmazott egér embrionális fibroblaszt sejt vonalat (ATCC: CCL-92) 10% hőinaktivált borjúsavóval, 2 mM L-glutaminnal, 100 IU/ml penicillinnel és 100 mg/ml sztreptomicinnel kiegészített DMEM tápfolyadékban tenyésztettük 37°C-on, 5% CO₂ tartalom mellett. A tápfolyadék valamennyi komponensét a Life Technologies-től vásároltuk (Carlsbad, CA, USA). A sejtek passzálását a 3.2.2 pontban leírtakhoz hasonlóan végeztük.

3.3. Csillós egysejtű modellen végzett vizsgálatok

3.3.1. *Tetrahymena pyriformis* proliferáció gátlás vizsgálat

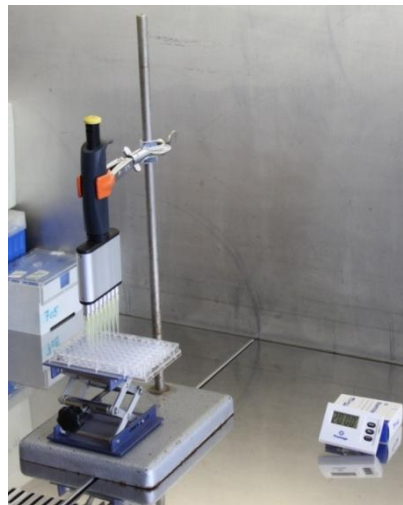
A környezeti szennyező gyógyszerhatóanyagok, ill. az AOP minták toxikus hatásának elemzéséhez 96 kamrájú tenyésztőlemezekbe (Sarstedt, Nümbrecht, Németország) 100 µl/kamra 10⁴ sejt/ml denzitású sejtuszpenziót helyeztünk. Ezután a sejteket 28°C-on 24 órán keresztül inkubáltuk a megfelelő koncentrációjú vizsgálandó anyaggal, legalább 5 párhuzamos mérést végezve. Negatív kontrollként minden esetben vagy tiszta tápfolyadékot alkalmaztunk, vagy a minták hígítására használt oldószert adekvát térfogat arányban tartalmazó tápfolyadékot. Az expozíciós idő elteltével a sejteket 4% formaldehidet (Reanal, Budapest) tartalmazó PBS-sel (0,05 M foszfát-puffer, pH 7,2, 0,9 M NaCl) fixáltuk 3:1 térfogat arányban, majd 15 perc elteltével az assay végpontjaként CASY TT (Innovatis–Roche, Bázél, Svájc) sejtszámláló készülékkel (ld. 3.3.3), mintánként 3 mérést végezve, meghatároztuk a sejtszámot. A mintáknál mért sejtszámokat a negatív kontroll értékére normalizáltuk és proliferáció gátlási százalékot (Prolif. Inh. (%)) számoltunk:

$$Prolif. Inh. (\%) = 100 - \frac{N_x}{N_{Ktrl}} \times 100$$

Ahol N_x és N_{Ktrl} a mintában, ill. a negatív kontrollban mért átlagos sejtszámot jelentik.

3.3.2. Kapilláris kemotaxis assay

A kapilláris kemotaxis módszer lényege, hogy a sejtek egy külső kamrában helyezkednek el, ami egy szűk kapilláris révén áll összeköttetésben a tesztoldatot tartalmazó belső kamrával. A munkacsoportunk által kidolgozott elrendezésben (133) a belső kamrát egy 8 csatornás pipetta steril, cserélhető hegyei jelentették, amelyekbe 100-100 μl -t szívunk fel a vizsgálni kívánt anyagok megfelelő koncentrációjú oldataiból (6. ábra). Külső kamraként egy 96 kamrájú steril tenyésztőlemez (Sarstedt, Nümbrecht, Németország) mélyedései szolgáltak, amelyekbe 420 μl sejtszuszpenziót helyeztünk. Mintánként legalább 4 párhuzamos mérést végeztünk. A kemotaxis assay inkubációs ideje, a Munkacsoportunk korábbi szimulációs eredményei alapján optimálisnak talált 20 perc volt (134). Ez alatt a 28°C-on történő inkubáció alatt a pozitív kemotaktikus választ adó sejtek a belső kamrában akkumulálódtak. Ezeket azután 4% formalint tartalmazó PBS oldattal fixáltuk 1:1 térfogatarányban és 15 perc elteltével CASY TT készülék segítségével határoztuk meg a sejtek számát.



6. ábra: A módosított kétkamrás kapilláris kemotaxis assay kísérleti elrendezése (133)

A mintákban mért sejtszámot összevetettük a tiszta tápfolyadékban (vagy megfelelő térfogat arányú oldószert tartalmazó tápfolyadékban) mért értékkel. A kapott százalékos arány a *Kemotaxis Index* (Ktx. Ind. (%)):

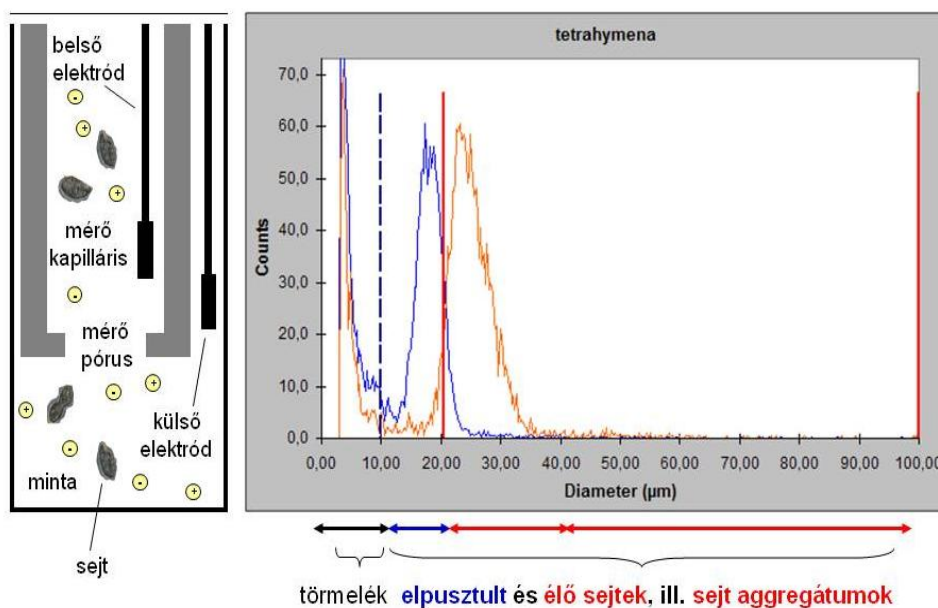
$$Ktx. Ind. = \frac{N_x}{N_{Ktrl}} \times 100$$

Ahol N_x és N_{ktrl} a mintában, ill. a negatív kontrollban mért átlagos sejtszámot jelentik. A

Ktx. Ind. értéke kemoattraktáns anyag esetében $> 100\%$, repellens hatásúnál $< 100\%$.

3.3.3. CASY TT sejtszámláló és analizáló készülék

A mérés lényege, hogy a berendezés az izoozmotikus és izotóniás pufferben (CASY ton, Innovatis–Roche, Bazel, Svájc) szuszpendált sejteket tartalmazó mintát egy elektromos térben található mérő kapillárison áramoltatja keresztül (7. ábra). Az elektródok közé érkező sejtek, elektromosan szigetelő foszfolipid kettős membránjuknak köszönhetően a puffer folyadékhoz képest nagyobb elektromos ellenállást jelentenek. Az alkalmazott erősítési és jelfeldolgozási lépéseknek köszönhetően a detektált ellenállás növekedés arányos a sejt méretével, így a készülék a sejtek méret szerinti eloszlását is képes meghatározni. Az elpusztult vagy sérült plazmamembránnal rendelkező sejtek által kiváltott ellenállás növekedés kisebb mértékű, mint az intakt sejtek által okozott, így az elpusztult valamint az élő sejtek eltérő méretűnek „látszanak”. Ezáltal a készülék képes ezek elkülönítésükre, százalékos arányuk meghatározására, valamint a sejtaggregátumok figyelembevételére is (7. ábra).



7 ábra: A CASY TT mérőkapillárisának sémája (bal oldal), ill. a Tetrahymena sejtek jellemző méreteloszlása (jobb oldal)

3.3.4. Foszfatidil-inozitol-3-kináz (PI3K) gátlás

A PI3K szerepét a szerves észterek által kiváltott kemotaxis szignalizációjában két specifikus gátlószer a wortmannin (Sigma–Aldrich, St. Louis MO, USA) és a LY29004 (2-(4-morfolinil)-8-fenil-4H-1-benzopirán-4-on) (Sigma–Aldrich, St. Louis MO, USA)

alkalmazásával, indirekt módon vizsgáltuk. Az előbbi egy a *Penicillium funiculosum* gomba által termelt természetes specifikus PI3K inhibitor (135), az utóbbi viszont egy széles körben alkalmazott szintetikus szer (136). Mindkét molekula az enzim ATP-kötőhelyéhez kapcsolódik, azonban eltérő helyekre (137).

A PI3K kemotaxisban betöltött szerepének méréséhez a *Tetrahymena* sejteket 5 percig inkubáltuk 10^{-5} M wortmanninal vagy 10^{-5} M LY29004-gyel. Ezután egy a tápfolyadékban történő mosási lépést követően az így előkezelt sejtekkel, a korábban erős attraktánsnak talált észterek megfelelő koncentrációit alkalmazva megismételtük a kemotaxismérést. Mivel mind a két gátlószer oldása DMSO-ban történt, kontrollként azonos DMSO-arányú tápfolyadékot használtunk. A PI3K gátlás mértékét az alábbi képlet alapján kiszámított *Gátlási Index (Inh. Ind.)* értékével jellemeztük:

$$Inh. Ind. (\%) = \frac{\frac{N_{g,x}}{N_{g,Ktrl}}}{\frac{N_x}{N_{Ktrl}}} \times 100$$

ahol $N_{g,x}$ és $N_{g,Ktrl}$ a PI3K gátlószeres előkezelésben részesült pozitív válaszadó sejtek átlagos száma az x tesztanyag, ill. a kontroll tápfolyadék esetében; N_x és N_{Ktrl} pedig az előkezelést nem kapó pozitív válaszadó sejtek átlagos száma a tesztanyagra és a kontroll tápfolyadéokra nézve.

3.3.5. Foszfolipáz-C aktivációjának vizsgálata

Az észterek hatását a foszfolipáz-C (PLC) aktivációjára áramlási citometriás módszerrel vizsgáltuk. Ehhez a sejteket 3, 5, 10 vagy 15 percig stimuláltuk a kemotaxismérésben attraktánsnak bizonyult észterek megfelelő koncentrációjú oldataival, majd 4%-os formalin tartalmú PBS-sel fixáltuk 1:1 térfogatarányban. Ezt követően a sejteket kétszer mostuk PBS-sel, majd 30 percig permeabilizáltuk a plazmamembránt 0,1 w/v% szaponin (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) tartalmú PBS oldattal. Ezután a sejteket 30 percig inkubáltuk sötétben a PLC aktivált formáját felismerő Alexa Fluor® 647 jelölést tartalmazó monoklonális antitesttel (BD Biosciences Pharmingen, San Jose, USA), amely a 783-as helyzetű foszfortirozinhoz kötődik. A jelölést követően a sejteket kétszer mostuk PBS-sel, majd 4%-os formalin tartalmú PBS-ben reszuszpendáltuk. Az intracelluláris fluoreszcencia intenzitást FACS készülékben (FACS-Calibur, Beckton–Dickinson, Franklin Lakes, NY, USA) határoztuk meg. A fluoreszcencia intenzitások

geometriai közepét a készülék CellQuest Pro szoftverével számítottuk ki, majd a kapott értékeket a kezeletlen, de jelölt negatív kontroll sejtek fluoreszcencia intenzitásához viszonyítottuk (*Normalizált Fluoreszcencia Intenzitás, NFI (%)*).

3.4. Sejtvonalakon végzett vizsgálatok

3.4.1. Mitokondriális szukcinát-dehidrogenáz alapú (MTT) viabilitás assay

Az MTT kolorimetriás viabilitás assay alapja, hogy az élő sejtekben működő mitokondriális szukcinát-dehidrogenáz enzim a sárga színű MTT (3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolium bromid) reagenst a tetrazólium gyűrű felnyílása mellett lila formazán vegyületté redukálja (138). A sejten belül keletkező kristályok detergenssel (pl. DMSO) történő szolubilizálását követően a 620 nm-es referencia hullámhossz mellett 540 nm-en mért optikai denzitás (OD) jele arányos az élősejtek számával (a 10^3 - 10^6 sejt/kamra tartományban).

A gyógyszerhatóanyagok citotoxikus hatásának meghatározásához egy 96 kamrájú steril tenyésztőlemezre ültettünk ki kamránként 10^4 sejtet. Ezeket 37°C-on CO₂ bevezetése mellett 24 órán keresztül előinkubáltuk, időt hagyva evvel a sejtek kitapadására és adaptálódására. Ezt követően a környezetszennyező gyógyszerhatóanyagok megfelelő töménységű oldataival további 24, 48 vagy 72 órán keresztül inkubáltuk a kitapadt sejteket. A durotaxist gátló, citoszkeletonra ható referencia anyagok esetében 1 órás expozíciós időt alkalmaztunk. Anyagonként legalább 5 koncentrációt vizsgáltunk (gyógyszerhatóanyagok: 10^{-5} - 10^{-3} M; citoszkeletális inhibitorok: 10^{-9} - 10^{-5} M) és koncentrációnként legalább 5 párhuzamos mérést végeztünk. Az expozíciót követően a sejtekről részben eltávolítottuk a tápfolyadékot, szükség esetén a sejteket friss tápfolyadékkal mostuk. Ezt követően a megmaradt térfogat 10%-ának megfelelő mennyiségű 5 mg/ml MTT reagenst (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) tartalmazó PBS-t adtunk a sejtekhez. A gyártó ajánlásait követve 4 órás sötétben történő inkubáció után a képződött formazán kristályokat DMSO-val oldottuk fel 20 perces, 350 rpm-en történő rázatás mellett. Végül minden kamrában leolvastuk az 540 nm-en, ill. a 620 nm-es referencia hullámhosszon mérhető optikai denzitást (Thermo/Labsystem Multiskan MS microplate reader, Thermo, Franklin, MA, USA). Valamennyi mérési eredményből kivontuk a sejtmentes tápfolyadéokra meghatározott referencia értékeket, majd a minták eredményeit a negatív kontrollok átlag értékére vonatkoztattuk.

3.4.2. AlamarBlue® viabilitás assay

A módszer alapja, hogy a rezazurin, egy kék színű nemfluoreszcens reagens az élő sejtekbe jutva – azok (a metabolikus aktivitással összefüggő) redukáló kapacitásának eredményeképpen –, vörösen fluoreszkáló rezorufinná alakul. A keletkező termék mennyisége 544 nm-es gerjesztő hullámhossz mellett 590 nm-en detektálható és a kapott fluoreszcencia intenzitás arányos az élő sejtek számával (az inkubációs időtől függően kb. a $5 \cdot 10^2$ – $5 \cdot 10^5$ sejt/kamra tartományban) (139).

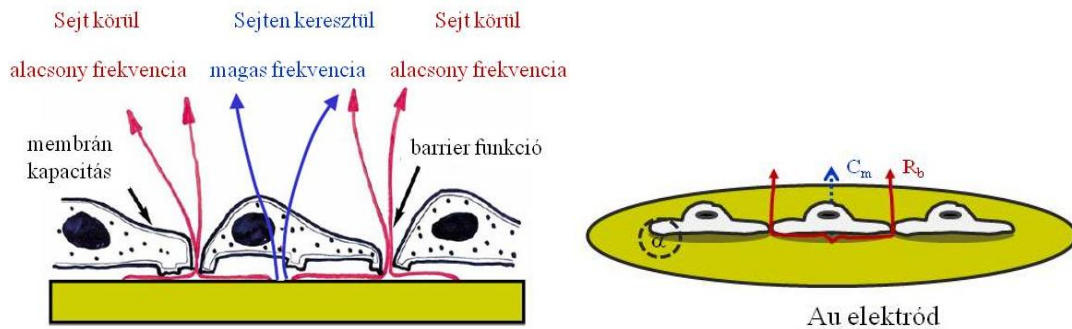
Az AlamarBlue® (Promega, Madison, WI, USA) assayt a durotaxis inhibíciót kiváltó gyógyszerek esetleges citotoxikus hatásának vizsgálata céljából alkalmaztuk. A teszt elvégzéshez kamránként 10^4 sejtet ültettünk ki 96 kamrájú műanyag tenyésztőlemezekre (Greiner BioOne, Frickenhausen, Németország), majd az MTT assaynél (ld. 3.4.1.) leírtakkal megegyezően előinkubáltuk és kezeltük a sejteket. Ezt követően a sejteket szükség esetén friss tápfolyadékkal mostuk, majd 10 v/v%-nyi AlamarBlue® oldatot adtunk hozzájuk. A 4 óra inkubációt (37°C, 5% CO₂) követően, 590 nm-es gerjesztő fényt használva fluoreszcencia intenzitást mértünk 544 nm-en (FLUOstar Omega, BMG Labtech, Ortenberg, Németország). Az MTT módszernél (ld. 3.4.1.) leírtakhoz hasonlóan a mintákra kapott intenzitásokból kivontuk a sejtmentes médium értékét, majd a negatív kontrollra normalizáltuk.

3.4.3. Impedancia alapú technikák

Az impedimetria elvi alapja, hogy a sejtek az elektromos térben ellenállásként viselkednek, ezért váltóáramú térben a sejtek elektród felszínre történő kitapadása valós időben impedancia növekedés formájában mérhető. Ezen impedancia-növekedés egyrészt a foszfolipid plazmamembrán szigetelő jellegének köszönhető, másrészt a kitapadt sejtek között kialakuló sejt-sejt kapcsolatoknak.

Jóllehet ma már több impedimetriás műszercsalád is elérhető, mindegyik működése azonos elven és modellen alapul, amelyet Giaever és Keese dolgozott ki (140). Eszerint az impedancia (Z) alapvetően 3 paramétertől függ: i) a membrán kapacitástól (C_m); ii) a sejtek közötti ellenállástól (R_b); iii) a sejtek és az elektród felszín kapcsolatát jellemző α -paramétertől (140). Emellett Z függ a váltóáram frekvenciájától (f , (Hz)) is, így különböző frekvenciájú áramot alkalmazva más-más sejtфизиológiai jelenségek detektálhatóak: pl. magas frekvencián (≈ 10 kHz) a sejtek kitapadását/kiterülését

mérhetjük, míg alacsony frekvencián (≈ 100 Hz) a sejt-sejt kapcsolatok barrier funkciójáról kaphatunk képet (8. ábra).





8. ábra: A sejtek elektródra történő kitapadásának következménye az áram haladására (baloldal) és az impedanciát befolyásoló tényezők (jobb oldal): membrán kapacitás (C_m), sejtek közötti ellenállás (R_b) és a sejt/elektród kapcsolatot jellemző „ α ” (140)

Méréseinket két műszercsalád tagjainak segítségével végeztük: egyrészt az xCELLigence SP (Roche, Bazel, Svájc) készülékben, másrészt az ECIS 1600 és ECIS Z0 (Applied Biophysics, Troy, NY, USA) műszerekben. Az azonos működési elv ellenére gyakorlati szempontból jelentős különbség van a két műszertípus (xCELLigence vs. ECIS) között az érzékenység és a mérhető paraméterek tekintetében (10. táblázat).

10. táblázat: Az alkalmazott impedimetriás műszerek összehasonlítása

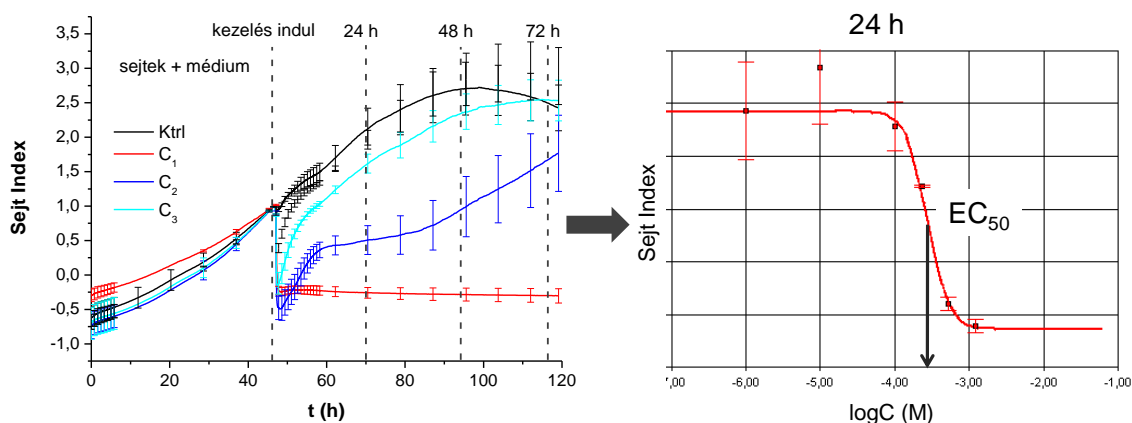
	xCELLigence	ECIS Z0
Frekvencia	10 kHz	400 Hz – 40 kHz
Párhuzamosok	96	2 x 8
Mért fizikai paraméter és annak képlete	<p>Sejt Index (SI)</p> $SI = \frac{Z(t) - Z(0)}{F}$ <p>$Z(t)$: impedancia a t időpontban $Z(0)$: impedancia a 0. időpontban F: frekvenciafüggő állandó $(F_{10\text{kHz}}=15)$</p>	<p>Z, R, C</p> $Z = \left(R^2 + \frac{1}{4\pi^2 f^2 C^2} \right)^{0,5}$ <p>Z: impedancia R: valós ellenállás f: frekvencia C: kapacitás</p>

10. táblázat folytatása

	xCELLigence	ECIS Z0
Detektálható sejtszintű jelenség	<ul style="list-style-type: none"> • adhézió/kiterülés • viabilitás 	<ul style="list-style-type: none"> • adhézió/kiterülés • viabilitás • sejt-sejt kapcsolatok • migráció
Elektródok: referencia és mérőelektród felszín (A) aránya	 $A_{ref} \approx A_{mérő}$	 $A_{ref} \gg A_{mérő}$
Vizsgálataink	<ul style="list-style-type: none"> • viabilitás 	<ul style="list-style-type: none"> • viabilitás • migráció • sebgyógyulás

3.4.3.1. Citotoxicitás vizsgálat

Az MTT módszer eredményei alapján szelektált 3 hatóanyag citotoxikus hatásának valós idejű mérését az xCELLigence SP (Acea Biosciences Inc., San Diego, CA, USA) rendszerben végeztük (ld. 10. táblázat). A sejtmentes médium (100 µl/kamra) impedanciájából adódó alapvonal kb. 60 percig CO₂-termosztátban (37 °C-on) történő rögzítését követően, a 96 kamrájú speciális tenyésztőlemez (96 E-plate, Acea Biosciences Inc., San Diego, CA, USA) minden kamrájába 100 µl 10⁵sejt/ml denzitású sejtszuszpenziót helyeztünk. Ezután a sejteket kb. 24 óráig 37°C-on CO₂ bevezetése mellett előinkubáltuk, majd kamránként 100 µl médiumot eltávolítva ugyanekkora térfogatban mértük be a vizsgálandó gyógyszerek megfelelő koncentrációjú oldatait (10⁻¹²–10⁻³ M). A mérés végeztével a készülék RTCA 2.1. szoftverével meghatároztuk a 24 h, 48 h ill. 72 h kezeléshez tartozó EC₅₀ értékeket (9.ábra). A program a koncentráció függvényében ábrázolt mért Sejt Index értékekre a négyparaméteres logisztikus egyenlet alapján (3.5.1) illesztett szigmoid lefutású koncentráció - hatás görbét.



9. ábra: Az xCELLigence rendszerben végzett valós idejű citotoxicitás mérés és az adatok kiértékelésének menete

3.4.3.2. Migrációmérések

Az ECIS-készülékben megvalósítható impedimetria alapú migrációmérések nagy előnye a korábbi, széles körben alkalmazott karcolásos módszerrel, ún. „scratch-assay”-vel szemben, hogy az elektromos impulzus révén kialakított seb a karcoláshoz képest sokkal reprodukálhatóbb méretű és geometriájú. Továbbá a sebgyógyulás folyamata valós időben követhető. Az ECIS-készülékek általunk alkalmazott két típusában (ECIS 1600 és ECIS Zθ) a sejtek migrációjának mérésére két megoldás érhető el. Egyrészt a már kiépült konfluens sejtrétegben hozhatunk létre folytonosság hiányt a mérőelektród felszínén megfelelő erősségű impulzust alkalmazva („sebgyógyulás”, „wound-healing”) az ECIS 1600 készülékben. Másrészt az újabb, Zθ típus az „electric fence” („elektromos kerítés”) funkció révén lehetőséget teremt arra, hogy a sejtek bemérését követően folytonos impulzusokkal megakadályozzuk azok mérőelektródon történő megtapadását és osztódását. Ezáltal a megfelelő inkubációs idő elteltével a csupasz mérőelektród körül konfluens sejtréteg alakulhat ki, amelynek sejtjei az „electric fence” kikapcsolását követően a mérő elektródra migrálnak és ezáltal impedancia növekedést okoznak.

A *wound-healing assay*hez első lépésben a 8 kamrájú array (8W1E array, Applied Byophysics, Troy, NY, USA) elektródjait 200 µl/kamra FBS-mentes sejttenyésztő folyadékot használva stabilizáltuk. Majd ez utóbbit 200 µl/kamra teljes médiumra cserélve felvettük a mérés alapvonalát (kb. 60 percen keresztül). Ezt követően minden kamrába 200-200 µl sejtuszpenziót adtunk, amelynek denzitása $5 \cdot 10^5$ sejt/ml volt a 3T3 fibroblasztnál, ill. $9 \cdot 10^5$ sejt/ml a HaCaT keratinociták esetében. Kb. 24 h

inkubációt követően (eddigre az impedimetriás görbe elérte a plató fázisát) a sejtekről 200-200 μl folyadékot eltávolítottunk és azonos térfogatú tesztoldattal kezeltük őket. A citoskeleton inhibitoroknál 1 h, a gyulladáscsökkentő és a β -blokkoló hatóanyagoknál 12 h kezelési időt alkalmaztunk. A kezelés után a sejteket 3-szor 400 μl friss médiummal mostuk, majd 30 perc ekvibrálódás után a 11. táblázatban bemutatott, részben a gyártó ajánlásai (impulzus ideje), részben előkísérletek alapján meghatározott (feszültség, frekvencia) paramétereket alkalmazva létrehoztuk a folytonosság hiányt. Minden kezelésből 4 párhuzamos mérést végeztünk, amelyekből kettőben elvégeztük a sebzést, kettőt pedig kezelt, de nem sebzett kontrollként meghagytunk.

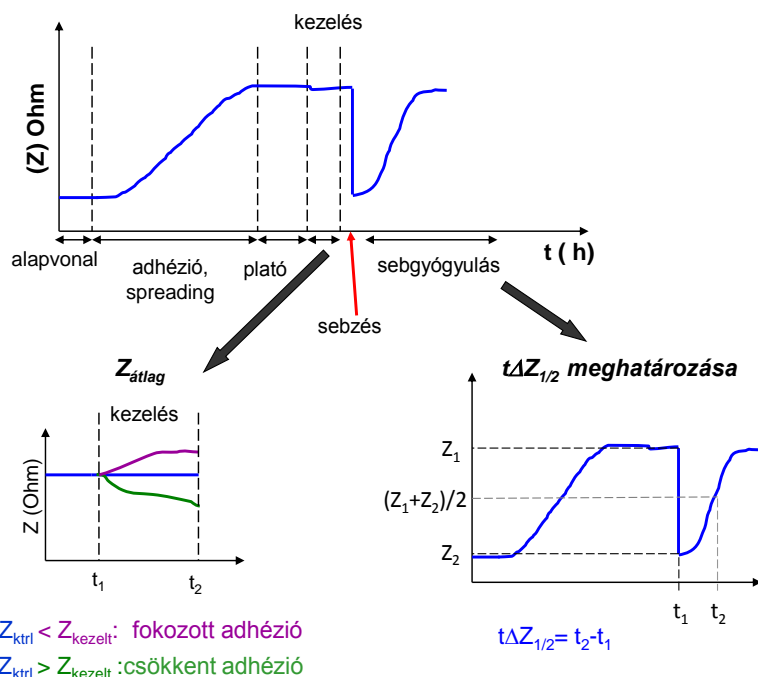
11. táblázat: Az ECIS 1600 készülék beállításai a seb létrehozásához

	3T3	HaCaT
Feszültség	4 V	6 V
Frekvencia	45 kHz	60 kHz
Impulzus ideje	60 s	60 s

A molekulák hatását 2 szempontból értékeltük ki. Egyrészt a kezelés ideje alatt az impedancia értékre (adhézióra/kiterültségre) gyakorolt hatást elemeztük, másrészt a kezelést követő sebgyógyulás kinetikáját vizsgáltuk. Előbbi hatást a kezelés közben mért átlagos impedancia kezeletlen kontrollhoz viszonyított értékével jellemeztük (norm. $Z_{\text{átlag}}$, %). A sebgyógyulás jellemzésére a kialakuló impedancia csökkenés 50%-os helyreállításához szükséges idő kezeletlen kontrollhoz viszonyított %-os értékét (norm. $t\Delta Z_{1/2}$, %), használtuk. A két index meghatározását a 10. ábra mutatja.

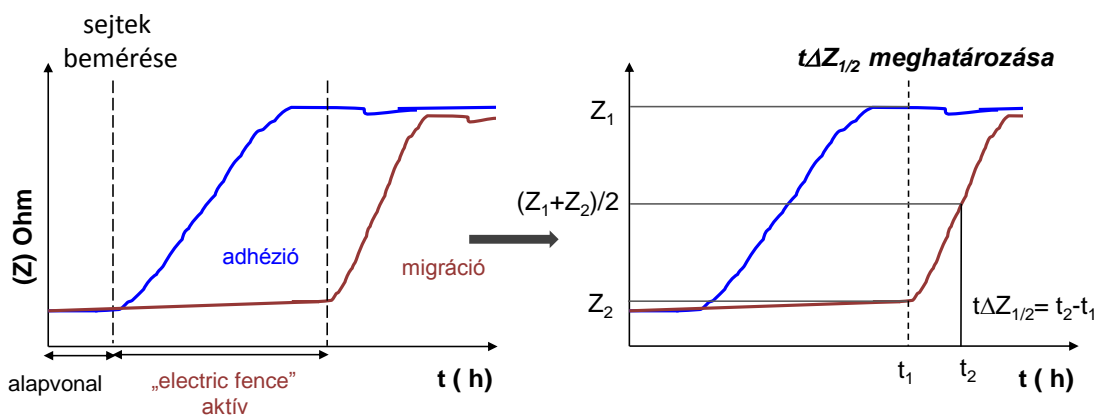
Az „*electric fence*” funkció alkalmazhatóságának vizsgálata során a fentiekben leírtakhoz hasonlóan elsőként az elektródok stabilizálását és az alapvonal felvételét végeztük el. Ezt követően 40 kHz frekvenciájú, 1 mA áramerősségű, 4,5nF kapacitású és 200 ms időtartalmú impulzusok formájában aktiváltuk az „*electric fence*” funkciót. Kamránként 200 μl 10^6 sejt/ml denzitású sejtszuszpenziót mértünk be, majd a plató fázis elérését követően (kb. 24 h) a sejtekről 200 ml médiumot eltávolítottunk, amit azonos térfogatú, 10^{-8}M végkoncentrációjú tesztoldattal pótolunk. Ezután kikapcsoltuk az „*electric fence*”-t és valós időben követtük a sejtek migrációját, amelyet a wound healing assay-nél bemutatott paraméter analógiájára a „*fence*” nélküli kontroll

impedancia 50%-ának eléréséhez szükséges idővel jellemeztünk (11. ábra). A kezelt sejtek ezen értékeit a nem kezelt %-os arányában fejeztük ki (norm. $t\Delta Z_{1/2}$, %).



10. ábra: A sebgyógyulási assay fázisai és a meghatározott paraméterek

Az értekezésben bemutatott, az elektródok felszínéről készült fotókat Zeiss AxioVision kutatómikroszkóp segítségével készítettük 10x vagy 40x nagyítást alkalmazva.

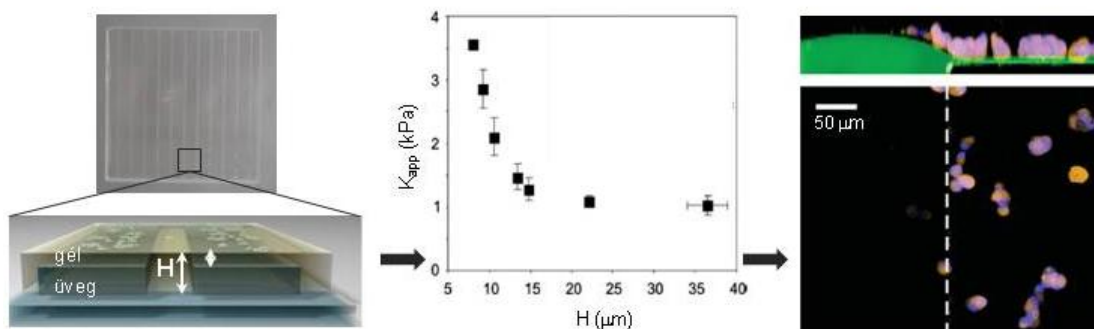


11. ábra: A migráció mérés fázisai az „electric fence” használata esetén és a migrációt jellemző paraméter meghatározása

3.4.4. Durotaxis assay

A rigiditás (*stiffness*) ugrásokat tartalmazó hidrogél mátrixok kialakításának alapelve, hogy, ha a sejteket egy kvázi végtelenül rigid (Young-modulus >50 GPa) üveglemezre rétegzett rugalmas hidrogélre ültetjük, a gél sejtek által érzékelt látszólagos rigiditása fordítottan arányos lesz a gél vastagságával (12. ábra), amennyiben ez utóbbi a gél deformációjával azonos mérettartományban van (141). A durotaxis assay során alkalmazott poliakrilamid (PAA) gélek elkészítése ezen összefüggés felhasználásával, a Kuo és munkatársai által kidolgozott módszer alapján történt (142).

A topográfiaileg megmunkált üveg tárgylemezeket az UQG Optics (Cambridge, Egyesül Királyság) állította elő rendelésre gyémántkés segítségével. Az így kialakított üveg felszínen egymástól 2 mm távolságra 200 μm széles, 200 μm mély és 2 cm hosszú barázdák helyezkedtek el (12. ábra).



12. ábra: A durotaxis assay alapját képező topológiaiileg megmunkált üveglemez (balra fent) és az azon kialakított hidrogél (balra lent); a rétegvastagság (H) és a látszólagos rigiditás (K_{app}) kapcsolata (középen); a CellTrackerOrange narancsszínű citoplazma és syto59-es kék magfestéssel jelölt fibroblasztok preferenciája a sekély, ezáltal nagyobb látszólagos rigiditású terület iránt oldalnézetből (fent) és felülnézetből (alul) (142)

A hidrogél üveghez való tapadását elősegítendő az üvegek felszínét kémiaiilag módosítottuk NaOH-os (0,1 M, 1 min), (3-aminopropil) trimetoxiszilános (97 v/v%, 3 min) és glutáraldehydes (0,5 w/w%, 30 min) előkezelések révén. Komprimált levegővel történő szárítást követően, a tárgylemezek felszínén 1 v/v% ammónium-perszulfát iniciátor (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) és 0,3 v/v% N,N,N',N'-tetrametiléndiamin (Acros Organics, Geel, Belgium) akcelerátor jelenlétében polimerizáltattuk a 30 v/v % akrilamid monomert (40 w/v%, BDH, Radnor, PA, USA)

és 10 v/v% N,N'-metilén-bisz(akrilamid) keresztkötő ágenszt (2 w/v% Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) tartalmazó PBS (Bioclear, Gallatin, TN, USA) alapú gél premixet. A kicseppentett oldatokat a gélesedés idejére előzetesen hidrofóbbá tett üvegfedőlemezekkel takartuk le. A gél rétegvastagságát a kimért térfogat határozta meg. Előkísérleteink során két féle rétegvastagságot (<15 µm és >50 µm) teszteltünk. A gélek teljes megszilárdulását követően a fedőlemezeket desztillált vízben való áztatás után lehúztuk. A géleket előbb 3 órán át hidrazinhidrátban (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA), majd 1 órán keresztül 5%-os ecetsavas (Sigma–Aldrich, St Louis, MO, USA) fürdőben áztattuk. Háromszori PBS-es mosás után a géleket 100 µg/ml poli-D-lizinben (PDL) (Millipore, Billerica, MA, USA) inkubáltuk 37°C-on, elősegítendő a sejtek kitapadását a gél felszínére. Háromszori PBS-ben történő mosást követően a gélek felszínére 500 µl $2 \cdot 10^5$ sejt/ml denzitású sejtuszpenziót helyeztünk, amelyeket előzetesen 1 óráig inkubáltunk a citoskeletonra ható szerek valamelyikével, vagy 12 óráig a diklofenák, ibuprofen, metoprolol és propranolol valamelyikével. A géleket 30 perc elteltével friss tápfolyadékba helyeztük és 24 óráig 37°C-on inkubáltuk őket. A sejteket a mikroszkópos kiértékelést megelőzően Hoechst 33342 (H3570, Life Technologies) festékkel jelöltük meg.

A sejtekről Zeiss LSM-510 konfokális lézer scanning mikroszkóp segítségével készítettünk gélenként 30-80 felvételt, amelyeket a Zeiss LSM Image Browser 4.2.0 programban értékeltünk ki. Ehhez a gél rigidebb, azaz alacsonyabb rétegvastagságú régióiban elhelyezkedő sejtek %-os arányát (Φ_s) az alábbi képlettel határoztuk meg:

$$\varphi_s = \frac{\frac{N_s}{A_s}}{\frac{N_s}{A_s} + \frac{N_r}{A_r}} \times 100$$

Ahol N_s és N_r a rigidebb, ill. a kevésbé rigid területeken található sejtek száma (ld. 12. ábra), A_s és A_r pedig a rigidebb, ill. a kevésbé rigid területek nagysága.

3.5. Statisztikai kiértékelés

Valamennyi mérési eredmény statisztikai kiértékelése *OriginPro8*[®] szoftverrel történt. Az eredmények negatív kontrollhoz viszonyított eltérésének szignifikáns voltát *egyutas ANOVA* módszerrel értékeltük ki. Az adatok normalitásáról a Shapiro–Wilkinson-teszt

segítségével, míg a varianciák homogenitásáról a Levene-próba és a Brown–Forsythe-teszt segítségével győződünk meg (143).

3.5.1. Gyógyszerhatóanyagok koncentráció-hatás görbéinek meghatározása

A gyógyszerhatóanyagok koncentráció-hatás görbéinek felvétele anyagonként 8 mérési pont alapján történt, a görbeillesztést pedig az alábbi 4 paraméteres logisztikus egyenlet szerint végeztük:

$$E(c) = \frac{E_{max} - E_{min}}{1 + \left(\frac{c}{EC_{50}}\right)^p} + E_{min}$$

Ahol $E(c)$ a c koncentrációhoz tartozó proliferáció gátló hatás erőssége (%), E_{max} és E_{min} a lehetséges maximális (100%), ill. minimális (0%) proliferáció gátló hatás erőssége, p a görbe meredeksége, az EC_{50} pedig az 50%-os gátló hatáshoz tartozó koncentráció. Az ilyen módon meghatározott koncentráció-hatás görbék alapján számítottuk ki a 0,25, 0,5, 0,75 és 1 TE-nek megfelelő hatóanyag koncentrációkat. Emellett az EC_1 értékeket szintén e görbékből állapítottuk meg regresszió értékek számítása segítségével (110).

3.5.2. Kölcsönhatások kiértékelése a kétkomponensű hatóanyag keverékekben

A koncentráció addíciós modell helytállóságát a gyógyszerhatóanyagok együttes proliferáció gátló hatásának leírására kétkomponensű, változó összetételű keverékekben vizsgáltuk. A keverék mért toxikus hatását, az azonos koncentrációban megfigyelt egyéni hatások összegével hasonlítottuk össze. Az eltérés szignifikanciáját egyutas ANVOVA-val határoztuk meg. Amennyiben nem tapasztalható szignifikáns eltérés, az anyagok additívan hatnak együtt. Ha a keverék toxikus hatása meghaladja az egyéni komponensek toxicitásának összegét, a kölcsönhatás szinergista. Ha a keverék toxikus hatása elmarad az egyedi anyagok hatásának összegétől az interakció antagonistikus típusú (113).

4. Eredmények

4.1. Csillós egysejtű modellen végzett vizsgálatok

4.1.1. Íz-és illatanyagok sejtélettani hatásai

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

Munkám bevezető szakaszában olyan egyszerű szerkezetű szerves kis molekulák (ld. 3.1.1) kemotaktikus hatását és ehhez kapcsolódó szignalizációját vizsgáltam, amelyeket a mindennapokban elsősorban íz- és illatanyagként gyárt, ill. használ az élelmiszeripar, valamint a kozmetikai ipar. Meglepő módon, bármilyen alacsony mennyiségben legyenek is jelen ezen illatanyagok a kozmetikumokban, mégis sikerült több mint 40 félért (pl. mentolt, fenil-etil-alkoholt, eugenolt) számottevő mennyiségben kimutatni az ú.n. szürkeszennyvízben (144). Ez utóbbi kifejezés a vízöblítéses WC használatából származó fekáliás szennyvizet nem tartalmazó, viszonylag kevésbé szennyezett háztartási vizekre utal. Ráadásul az általunk vizsgált illatanyagok közül némelyek (pl. izoamil-acetát) nagyobb mennyiségben is felhasználásra kerülnek oldószerekben, faanyagok lakkozásához, vagy fényezéséhez használt bevonatokban (145) így egyéb úton is bekerülhetnek a környezetbe.

Az illatanyagok elsődleges biológiai rendeltetése a beporzást végző rovarok csalogatása, ill. a kártevők távoltartása (146). Ebből adódóan a filogenezis különböző szintjein álló élőlények széles körében sikerült eddig igazolni a mozgási viselkedést befolyásoló képességüket (pl. izoamil-actát: *D. melanogaster* (147) és *C. elegans* (148)). Az illatanyagok kemoszenzoros érzékelésében résztvevő jelátviteli útvonalak nagyfokú evolúciós konzerváltságot mutatnak, továbbá az eukarióta egysejtűek kemotaxisában a magasabb rendű szervezetek szagló receptoraival jelentős homológiát mutató G-protein kapcsolt receptorok (GPCR) (149) és jelátviteli komponensek vesznek részt (150). Ugyanakkor az illatanyagok szignalizációjában a különböző másodlagos hírvivők (pl. c-AMP, inozitol-1,4,5-trifoszfát (IP₃)) szerepe egyelőre nem tisztázott (151).

Az alábbiakban ismeretett eredményeként Tetrahymena modellen mértük, ami egyrészt képes érzékenyen reagálni akár 10⁻¹²-10⁻⁹ M koncentrációban jelenlevő illatanyagokra (pl. eugenol, karvakrol, mentol) (152; 153); másrészt kemoszenzoros jelátviteli

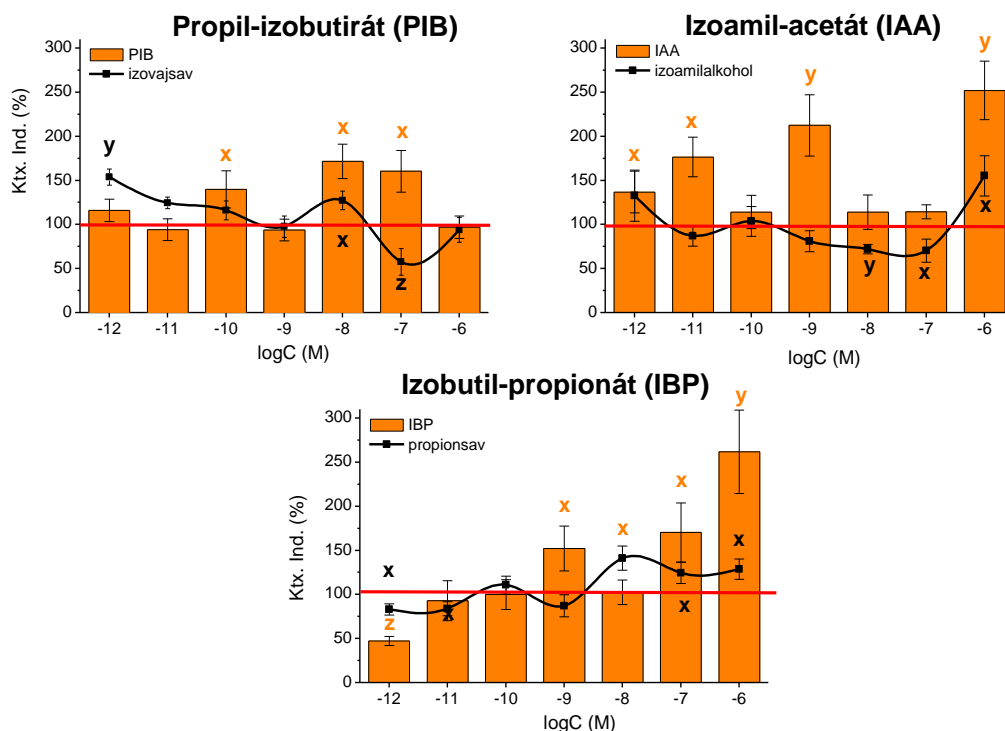
útvonalai az emlősökkel nagyfokú homológiát mutatnak (153). Ezáltal alkalmas modell az illatanyagok biokémiai és viselkedés befolyásoló hatásának tanulmányozására.

4.1.1.1. Íz- és illatanyagok kemotaktikus hatása

A 7 észter, valamint a szintézisükhöz használt 3 sav és 2 alkohol, továbbá a 4 aromás aldehid vizsgálatával elsősorban a kismértékű szerkezeti eltérést mutató molekulák által kiváltott migrációs válaszok azonos, vagy eltérő voltát kívántuk elemezni. Emellett az illatanyagok szintéziséhez használt reagensek és maguk az észterek által kiváltott válaszok esetleges átfedéseit szeretnénk volna tanulmányozni.

A mérési eredmények összefoglalása:

A 3 szerkezeti izomer ($C_7H_{14}O_2$ összegképletű) *izoamil-acetát* (IAA), *izobutil-propionát* (IBP) és *propil-izobutirát* (PIB) kemotaktikus karaktere között hasonló és eltérő vonásokat is tapasztaltunk (13 Ábra). Hasonlóság volt, hogy az IAA és az IBP egyaránt erőteljes attraktáns jelleget mutattak 10^{-6} M koncentrációban (IAA: Ktx. Ind. = 252%; IBP Ktx. Ind. = 262%) és valamivel gyengébbet 10^{-9} M-on (IAA: Ktx. Ind. = 212%; IBP Ktx. Ind. = 152%). A 3. izomer, a PIB szintén attraktánsként viselkedett (140,0% <Ktx. Ind.< 171,7%), hatásos koncentrációtartománya (10^{-10} , 10^{-8} , 10^{-7} M) az IBP-ével részben át is fedett (10^{-9} - 10^{-6} M). A csoporton belül a legszembetűnőbb eltérés a 3 anyag között a kizárólag az IBP-re jellemző repellens jelleg volt (10^{-12} M, Ktx. Ind. = 47,4%). Az anyagok szintézise során felhasznált reagensek kemotaktikus profilját az észterekével összevetve, a legjelentősebb hasonlóságot az IBP és a propionsav között tapasztaltuk. Mind a sav, mind az észter kettős viselkedést mutatott, amelyeknek hatásos koncentrációi nagymértékben átfedtek (attraktáns: 10^{-7} és 10^{-6} M; repellens: 10^{-12} M). Az IAA és az izoamilalkohol, valamint a PIB és az izovajsav között is átfedést találtunk a kemoattraktáns koncentrációk tekintetében (10^{-6} M, ill. 10^{-8} M). Ugyanakkor mindkét párban lényeges különbség volt, hogy a reagensek, az észterekkel ellentétben, repellens viselkedést is mutattak (10^{-8} , 10^{-7} M, ill. 10^{-7} M).



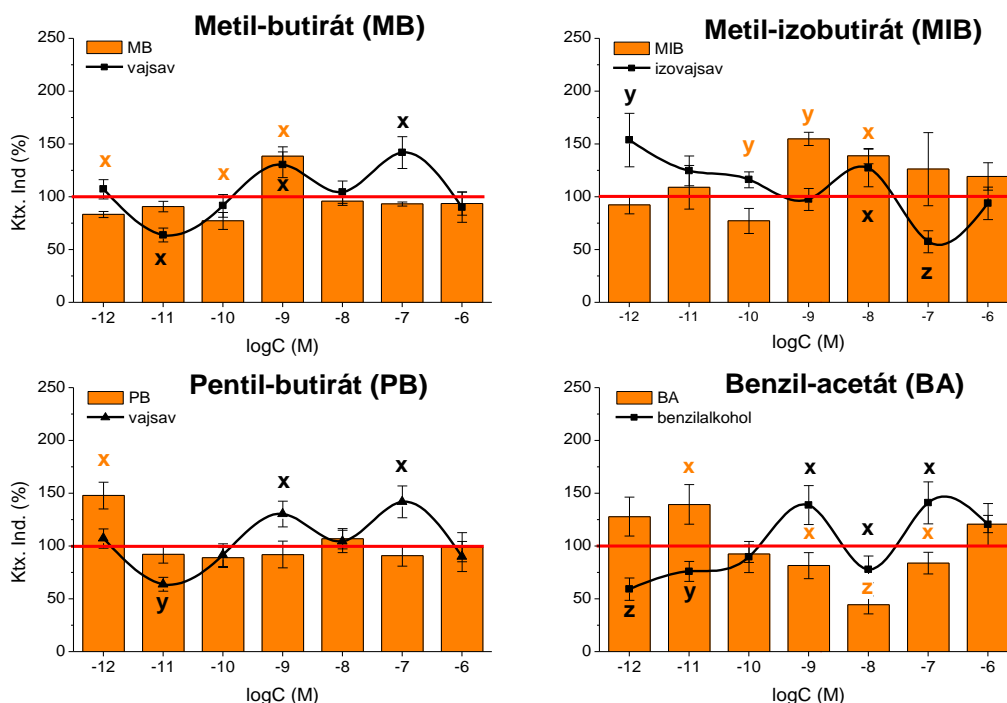
13. ábra: A $C_7H_{14}O_2$ összegképletű szerkezeti izomer illatanyagok és a szintézisükhöz használt reagensek kemotaktikus profilja. Szignifikancia szintek: $x: p < 0,05$; $y: p < 0,01$; $z: p < 0,001$.

A $C_5H_{10}O_2$ összegképletű két izomer *metil-butirát* (MB) és *metil-izobutirát* (MIB) hasonló kemotaktikus aktivitással rendelkezett: mindkét anyag attraktáns volt 10^{-9} M-ban (MB: Ktx. Ind. = 138,5%; MIB: Ktx. Ind. = 154,9%) és repellens 10^{-10} M-ban (MB: Ktx. Ind. = 83,3%; MIB: Ktx. Ind. = 77,2%). A MB esetében e repellens hatás 10^{-12} M-ban is jelentkezett. A MIB esetében viszont az attraktáns hatás érvényesült a 10^{-9} M-hoz közeli 10^{-8} M-os koncentrációin is. A vajsav és az izovajsav kemotaktikus karakterével összevetve a MB és MIB profilját hasonlóság, hogy a savak szintén kettős viselkedést mutattak, volt attraktáns és repellens hatásuk is. Ugyanakkor a hatásos koncentrációk tekintetében egyezés a MB-vajsav párban a 10^{-9} M-os attraktáns csúcs, a MIB-izovajsav párban pedig a 10^{-8} M-ban tapasztalt attraktáns jelleg.

Az utolsó vajsav észter a *pentil-butirát* (PB) 10^{-12} M-os koncentráción mutatott egyedül szignifikáns kemotaktikus hatást, amelynek jellege attraktáns volt (Ktx. Ind. = 147,9%). Ezáltal nem mutatott átfedést a vajsav kemotaktikus viselkedésével (14. ábra).

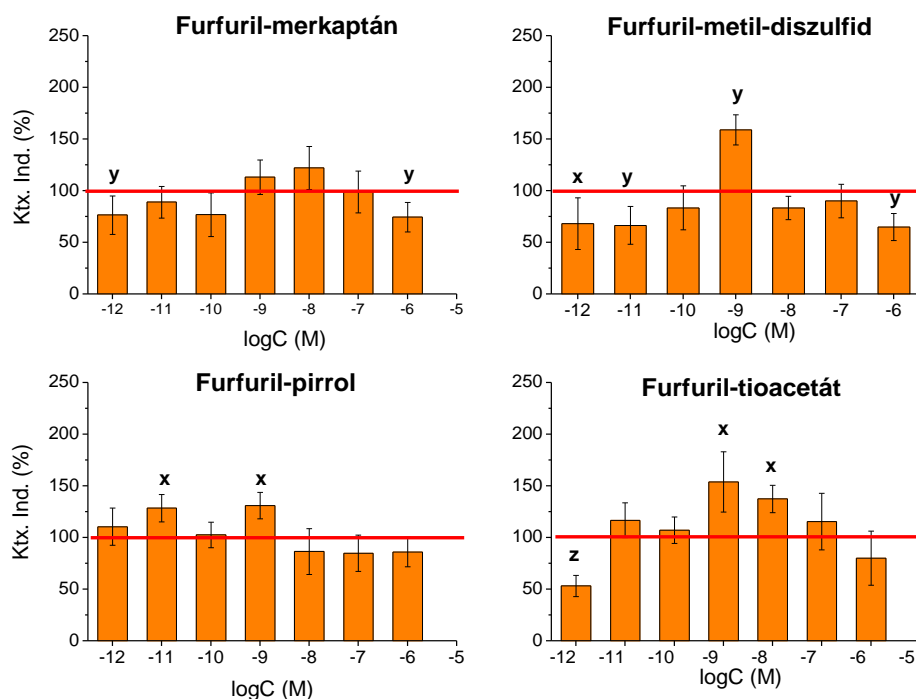
Az aromás gyűrűt tartalmazó *benzil-acetát* (BA) alacsony, 10^{-11} M-os koncentráción attraktáns (Ktx.Ind. = 139,6%) közepes koncentráción (10^{-9} - 10^{-7} M) repellens volt

(44,4% < Ktx. Ind. < 83,3%). A benzil-alkoholra, szintén jellemző volt a kettős viselkedés, azonban a hatásos koncentrációk tekintetében csak a 10^{-8} M-os repellens csúcsban tapasztaltunk hasonlóságot a BA-hoz (14. ábra).



14. ábra: A szerkezeti izomer metil-butirát és metil-izobutirát, valamint a pentil-butirát és a benzilacetát kemotaktikus profilja, ill. a szintézishez használt reagensek kemotaktikus aktivitása

Az aromás aldehidek közül a furfural-merkaptánra azonos erősségű repellens viselkedés volt jellemző a legalacsonyabb (10^{-12} M; Ktx.Ind. = 74,4%) és a legmagasabb vizsgált koncentrációban (10^{-6} M; Ktx.Ind. = 74,6%) (15. ábra). Ezzel szemben a furfural-pirrol enyhe attraktáns jelleget mutatott 10^{-11} és 10^{-9} M-os koncentrációban (Ktx. Ind. \approx 130%). A metil-furfural-diszulfidnál és a furfural-tioacetátnál mind attraktáns, mind repellens viselkedést tapasztaltunk. Előbbinél a repellens jelleg dominált, ami 10^{-12} , 10^{-11} és 10^{-6} M-ban is megfigyelhető volt (Ktx.Ind. \approx 65%), míg attraktáns hatást csak 10^{-9} M-ban kaptunk (Ktx. Ind. = 158,9%). A furfural-tioacetátnál az attraktáns jelleg 10^{-9} és 10^{-8} M-os koncentrációban jelentkezett (Ktx.Ind. 137,4% és 153,9%), a repellens hatás pedig 10^{-12} M-ban (Ktx.Ind. = 53,1%).



15. ábra: A 4 aromás aldehid kemotaktikus profilja

Összegezve elmondható, hogy a kis molekulaszervezetbeli különbségeket tartalmazó anyagcsoportok tagjaira adott kemotaktikus válaszok, jól lehet mutattak hasonlóságokat, nem egyeztek meg teljes mértékben. Ugyancsak, az észterek és az azok szintéziséhez használt alkoholok és savak kemotaktikus jellege között 1-1 csúcsban volt megfigyelhető hasonlóság, ám a hatásos koncentrációk nem teljesen egyeztek meg.

4.1.1.2. A foszfolipáz-C és a foszfatidil-inozitol-3-kináz aktivációja a kemoattraktáns észterek szignalizációja során

A foszfolipáz-C (PLC) és a foszfatidil-inozitol-3-kináz (PI3K) a kemoattraktáns válasz és az annak következtében kialakuló sejtélettani reakciók szempontjából igen jelentős enzimek (154; 155), amelyek az foszfo-inozitol másodlagos hírvivők szintézisében kulcsszerepet játszanak. Ezutóbbinak szerepe a szaglásban a szagingerek kémiai percepciójában azonban egyelőre nem tisztázott.

Munkánk során éppen ezért vizsgálni kívántuk a PLC és a PI3K aktivációját a kemoattraktáns észterek által beindított szignalizációs folyamatokban. Ehhez mindkét enzim esetében a sejteket az 4.1.1.1.-ben ismertetett, legszignifikánsabb hatást kiváltó észterek megfelelő koncentrációival stimuláltuk (IAA, IBP, MB, MIB: 10^{-9} M; PIB: 10^{-8} M és PB: 10^{-12} M).

A mérési eredmények összegzése:

A foszfolipáz-C enyhe aktivációját 2 észternél tapasztaltuk: a MB-nál 10 perces stimulációt követően és a PIB-nál 15 perces stimulációt követően (12. táblázat).

12. táblázat: A kemoattraktáns észterekkel történő eltérő idejű stimuláció hatására bekövetkező PLC aktiváció (a kezeletlen kontroll %-ában kifejezve)

	Normalizált fluoreszcencia intenzitás (%)			
	3 min.	5 min.	10 min.	15 min.
IAA	96,5	114,5	104,9	103,6
IBP	88,3	81,0	106,2	97,9
MB	86,0	81,6	128,0^x	111,8
MIB	101,3	93,9	110,7	99,2
PIB	88,1	108,1	95,4	126,5^x
PB	96,5	114,5	104,9	103,6

A foszfatidil-inozitol-3-kináz gátlása a kemoattraktáns észterekre adott migrációs válasz kialakulását nem befolyásolta jelentősen. A wortmanninos inhibíció egyik észter esetében sem gátolta a kemotaktikus válasz létrejöttét, míg a LY294002 alkalmazásakor enyhe gátlást tapasztaltunk az IAA és az IBP esetében (IAA: Inh. Ind. = 84%; IBP: Inh. Ind. = 77%).

4.1.2. Gyakori vízi szennyező gyógyszerhatóanyagok sejtélettani hatásai

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

A vízi szennyező gyógyszerhatóanyagok esetleges ökotoxikus hatásának reális megítéléséhez jelenleg nem áll elég adat rendelkezésre az irodalomban. Általában az akut toxicitás assayben tapasztalt effektív koncentrációk nagyságrendekkel meghaladják a környezeti koncentrációkat (pl. trimetoprim, eritromicin $EC_{10Lemna} > 1$ mg/ml (156); metoprolol $EC_{50Lemna} > 320$ mg/l (157); acetilszalicilsav > 10 mg/l (158)). Ugyanakkor leírtak olyan eredményeket is (pl. ibuprofén, szulfametoxazol (72) és propranolol (159) esetében), amelyek szerint a korábban detektált környezeti koncentrációkkal azonos nagyságrendű (100–1000 ng/l) krónikus expozíció mellett kialakulhatnak szignifikáns biológiai hatások pl. bioakkumuláció, viselkedési változások stb.

Munkánk során éppen ezért az 1.2.2. fejezetben ismertetett leggyakoribb vízi szennyező gyógyszerhatóanyagok sejtélettani hatásait kívántuk vizsgálni két sejtfiziológiai válaszra, a klasszikusnak számító proliferációra és a ritkábban vizsgált kemotaxisra fókuszálva.

4.1.2.1. Gyógyszerhatóanyagok proliferáció gátló hatása

A gyógyszerhatóanyagok a proliferációra gyakorolt hatásának mérését a 3.3.1.-es pontban ismertetett rendszerben végeztünk el. Kísérleteink célja annak megítélése volt, hogy van-e a hatóanyagoknak 24 órás expozíció mellett toxikus hatása a környezeti szempontból releváns koncentrációtartományban ($< 10^{-8}$ M), ill. hol kezdődik a toxikus koncentráció tartomány az egyes molekulák esetében. Ehhez kísérleteinkben a 10^{-11} - 10^{-3} M koncentráció tartományt vizsgáltuk (13. táblázat). A 24 órás expozíciós időből és a *Tetrahymena* 2,5 órás generációs idejéből adódóan a teszt során kb. a 10. generációt vizsgáltunk, ezáltal a módszer krónikus ökotoxicitási assayként fogható fel.

A mérési eredmények rövid összefoglalása:

Az *NSAID*-k az egyik leghatásosabb proliferáció gátló molekulacsaládnak bizonyultak, mivel mind az 5 képviselőjüknel megfigyelhető volt szignifikáns toxikus hatás. A hatásos koncentrációk tekintetében azonban jelentős különbségek voltak az egyes molekulák között. A legalacsonyabb hatásos koncentráción mért proliferáció gátlás erőssége alapján az anyagok toxicitásának sorrendje: naproxén (Nap) (10^{-3} M; 48,8%) $<$ fenoprofén (Fen) (10^{-4} M; 21,6%) $<$ ibuprofén (Ibu) (10^{-4} M; 40,0%) $<$ diklofenák (Dik) (10^{-4} M; 35,6%) $<$ acetyl szalicilsav (AcSzal) (10^{-11} M; 17,2%).

A *fájdalom- és lázcsillapító* paracetamol (Par) a modell-sejt proliferációját a 10^{-5} M- 10^{-3} M tartományban szignifikánsan fokozta (20,6 – 42,0%-kal).

Az *antibiotikumok* között 3 eltérő toxicitás profil volt megfigyelhető. Az eritromicin (Eri) alacsony koncentráción (10^{-10} – 10^{-8} M) enyhén növelte a proliferációt (13,4 – 25,4 %). A trimetoprim (Tri) és a szulfametoxazol (Szul) magasabb koncentrációkban csökkentették a proliferációt (trimetoprim: $> 10^{-7}$ M 11,6 - 69,0%-kal; szulfametoxazol: 10^{-3} M koncentrációban 21,8%-kal). A linkomicin (Lin) pedig semelyik vizsgált koncentráción sem befolyásolta szignifikánsan a sejtproliferációt.

13. Táblázat: A környezeti szennyező gyógyszerhatóanyagok hatása a proliferációra

Molekula	Proliferáció változás (%) [*]								
	10^{-11}	10^{-10}	10^{-9}	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}
AcSz	-17,2 ^x	-16,6 ^x	-25,0 ^y	-26,1 ^z	-13,2	-7,6	-11,6	+1,0	+1,2
Dik	+24,6	+4,4	+14,4	+26,5	+30,0	+8,8	+0,5	-35,6 ^x	-76,4 ^z
Fen	+10,8	+15,0	+3,0	-12,0	-6,2	-1,0	-4,8	-21,6 ^y	-82,6 ^z
Ibu	+32,0	+35,6	+16,0	+19,8	+14,6	-4,0	+5,0	-40,0 ^y	-71,4 ^y
Nap	-5,4	-4,6	-21,3	+0,4	-7,8	-1,0	+2,2	+6,8	-48,8 ^y
Par	+0,8	+10,7	+2,6	+5,4	+18,2	+10,8	+20,6 ^x	+28,8 ^x	+42,0 ^x
Eri	+11,2	+25,4 ^y	+19,6 ^y	+13,4 ^x	+7,4	+2,6	+10,4	+0,6	-0,1
Lin	+13,9	+11,6	+0,3	-10,3	-1,4	-0,1	-5,3	-5,2	-7,1
Szul	3,4	+18,8	+4,2	-6,8	-12,6	-6,8	-12,2	+0,2	21,8 ^x
Tri	-8,6	+8,8	-0,8	-0,75	-24,6 ^y	-20,0 ^y	-11,6 ^x	-15,0 ^x	-69,0 ^y
Met	+3,1	+9,7	+2,7	0,4	+3,4	+17,1	-12,4 ^x	-41,3 ^y	-82,0 ^z
Pro	10,2	+27,0	-0,6	-8,8	+2,6	-13,5 ^x	-39,1 ^y	-91,1 ^z	-94,2 ^z
Tim	-4,1	+4,7	+7,7	+3,6	+3,1	-5,0	-20,5 ^x	-29,9 ^y	-75,9 ^z
Na-dia	+13,6	+15,1	+7,3	+7,1	+15,4	+10,1	+1,3	-12,0	+16,0 ^x

* „-” előjel: proliferáció csökkentés; „+” előjel: proliferáció növekedés;

** : bordó: szignifikáns proliferáció fokozás; kék: szignifikáns proliferáció gátlás

A β -adrenerg antagonisták az NSAID-k mellett a másik legtoxikusabb csoportot jelentették, mivel 10^{-5} M –os, vagy töményebb koncentrációban mind a 3 molekula szignifikánsan csökkentette a sejtproliferációt. Az anyagok relatív toxicitási sorrendje metoprolol (Met) (10^{-4} M; 12,4%) \approx timolol (Tim) (10^{-4} M; 20,5%) < propranolol (Pro) (10^{-6} M; 13,5%) volt.

A kontrasztanyag Na-diatrizoát (Na-dia) a legmagasabb koncentrációban (10^{-3} M) enyhén fokozta (16,0%) a Tetrahymena proliferációját.

Összegezve, eredményeink azt mutatták, hogy a 14 hatóanyag közül a környezeti szempontból releváns $<10^{-8}$ M koncentráció tartományban egyedül az acetilszalicilsav mutatott enyhe proliferáció gátló hatást, ill. az eritromicin enyhén fokozta a proliferációt.

4.1.2.2. Gyógyszerhatóanyag keverékek proliferáció gátló hatása

A szennyezőanyag keverékek vizsgálatának jelentőségét az adja, hogy ezekben az egyéni hatásokhoz képest akár fokozott biológiai aktivitás is létrejöhet (szinergizmus); ill. additív együttes hatás mellett az önmagukban szignifikáns hatást nem eredményező koncentrációban jelenlevő komponensek keveréke is kiválthat jelentős hatást (160).

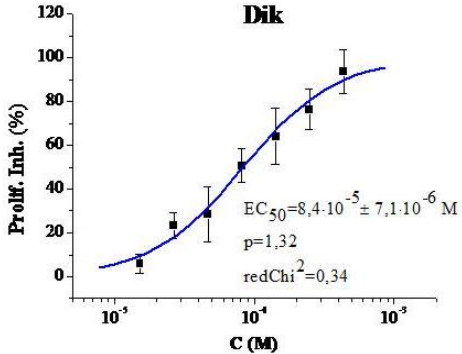
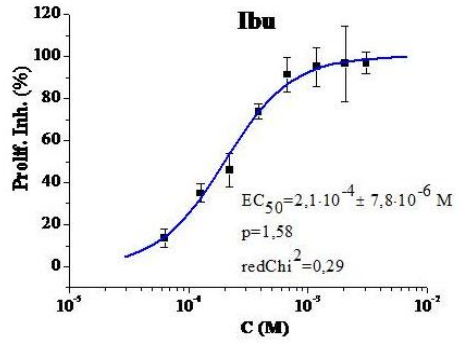
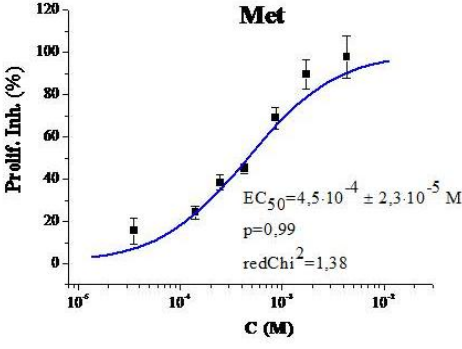
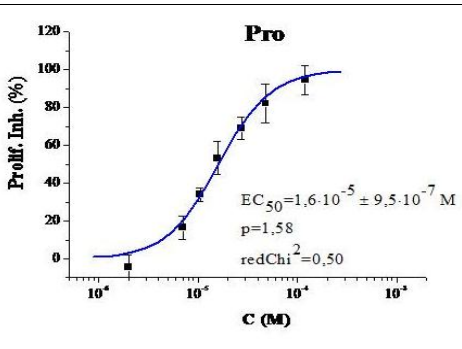
Munkánk során a gyógyszerhatóanyagok keverékekben kifejtett hatásának additivitását elemeztük kétkomponensű elegyekben. A kétkomponensű elegyek vizsgálatát a praktikus megfontolások mellett az is indokolta, hogy sokkomponensű szerves szennyező elegyek vizsgálata során a bináris kölcsönhatásokat jelentősebbnek találták, mint a terciér és kvaterner interakciókat (161). A keverékeket alkotó gyógyszerhatóanyagokat a proliferáció gátlási assay eredményei alapján (4.1.2.1.) 3 szempontot figyelembe véve választottuk ki: i) hatás erőssége; ii) vízoldhatóság; iii) hatásmechanizmus. Ezek alapján a legtoxikusabbnak talált NSAID és β -adrenerg antagonistá csoportból választottunk 2-2 vízoldható anyagot: a diklofenákot és az ibuprofént, ill. a propranololt és a metoprololt. Ezáltal azonos és különböző hatásmechanizmusú komponensekből álló keverékeket is ki tudtunk alakítani. Először e 4 hatóanyag egyéni koncentráció-hatás görbéjét vettük fel, majd 2^4 faktoriális elrendezést alkalmazva hatóanyag-páronként 16 keveréket vizsgáltunk (3.1.4.).

A mérési eredmények rövid összefoglalása:

EC_1 érték alapján egyformán Met<Ibu<Dik<Pro -nak adódott (14. táblázat). A tapasztalt EC_1 értékek a környezeti koncentrációkat legalább 2-3 nagyságrenddel meghaladták.

A *Dik* + *Ibu* keverékeknél additív együttes hatást csak a legalacsonyabb összkoncentrációjú keverékben (0,25 Toxikus Egység *Dik* + 0,25 Toxikus Egység *Ibu*) tapasztaltunk, minden más esetben antagonizmus volt megfigyelhető (15. táblázat). A Toxikus Egységben kifejezett koncentrációkat a továbbiakban a TE rövidítéssel jelezzük.

14. táblázat: A keverékek elkészítéséhez használt 4 hatóanyag egyedi koncentráció - hatás görbéje, EC_{50} értéke, valamint regresszióval meghatározott EC_1 értéke

Illesztett koncentráció-hatás görbe	EC_{50}	EC_1
 <p>Dik</p> <p>Profl. Inh. (%)</p> <p>$EC_{50}=8,4 \cdot 10^{-5} \pm 7,1 \cdot 10^{-6}$ M $p=1,32$ $redChi^2=0,34$</p> <p>C (M)</p>	$8,4 \cdot 10^{-5}$ M 12,0 mg/l	$2,6 \cdot 10^{-6}$ M 0,8 mg/l
 <p>Ibu</p> <p>Profl. Inh. (%)</p> <p>$EC_{50}=2,1 \cdot 10^{-4} \pm 7,8 \cdot 10^{-6}$ M $p=1,58$ $redChi^2=0,29$</p> <p>C (M)</p>	$2,1 \cdot 10^{-4}$ M 29,7 mg/l	$1,1 \cdot 10^{-5}$ M 2,6 mg/l
 <p>Met</p> <p>Profl. Inh. (%)</p> <p>$EC_{50}=4,5 \cdot 10^{-4} \pm 2,3 \cdot 10^{-5}$ M $p=0,99$ $redChi^2=1,38$</p> <p>C (M)</p>	$4,5 \cdot 10^{-4}$ M 181,0 mg/l	$1,6 \cdot 10^{-5}$ M 11,0 mg/l
 <p>Pro</p> <p>Profl. Inh. (%)</p> <p>$EC_{50}=1,6 \cdot 10^{-5} \pm 9,5 \cdot 10^{-7}$ M $p=1,58$ $redChi^2=0,50$</p> <p>C (M)</p>	$1,6 \cdot 10^{-5}$ M 4,8 mg/l	$8,9 \cdot 10^{-7}$ M 0,3 mg/l

p: az illesztett görbe meredeksége; $redChi^2$: az illesztést jellemző statisztikai paraméter

15. táblázat: A Dik + Ibu hatóanyag-pár keverékeiben megfigyelt együttes hatások

Keverék	C (TE)		Prolif. Inh. (%)		Együttes hatás
	Dik	Ibu	Mért	Prediktált	
0,50	0,25	0,25	18,7 ± 7,3	24	additív
0,75	0,25	0,5	27,9 ± 4,4	39	antagonizmus
0,75	0,5	0,25	24,6 ± 2,9	39	antagonizmus
1	0,25	0,75	39,1 ± 5,5	50	antagonizmus
1	0,5	0,5	32,4 ± 3,6	50	antagonizmus
1	0,75	0,25	39,9 ± 1,8	50	antagonizmus
1,25	0,25	1	48,1 ± 4,4	64	antagonizmus
1,25	0,5	0,75	48,4 ± 6,8	68	antagonizmus
1,25	0,75	0,5	42,7 ± 11,2	66	antagonizmus
1,25	1	0,25	49,5 ± 7,3	60	antagonizmus
1,50	0,5	1	56,3 ± 5,9	79	antagonizmus
1,50	0,75	0,75	51,8 ± 4,1	79	antagonizmus
1,50	1	0,5	57,0 ± 6,9	75	antagonizmus
1,75	0,75	1	59,5 ± 3,6	91	antagonizmus
1,75	1	0,75	66,0 ± 5,2	89	antagonizmus
2	1	1	73,1 ± 3,6	100	antagonizmus

A Dik + Met keverékek felénél az additivitás érvényesült (0,5 TE, 0,75 TE, 1,25 TE és 1,75 TE összkoncentrációkon). Antagonizmust viszont egyedül a legtöményebb összkoncentrációjú oldatban (1 TE Dik + 1 TE Met) tapasztaltunk. Emellett a 6 hatóanyag pár közül egyedül itt figyeltünk meg szinergista kölcsönhatást, ami valamennyi 1 TE és 1,5 TE összkoncentrációjú keverékben, ill. az 1 TE Dik + 0,25 TE Met oldatban jelentkezett. (16. táblázat).

16. táblázat: A Dik+Met hatóanyag-pár keverékeiben megfigyelt együttes hatások

Keverék	C (TE)		Prolif. Inh. (%)		Együttes hatás
	Dik	Met	Mért	Prediktált	
0,5	0,25	0,25	28,8 ± 5,0	34	additív
0,75	0,25	0,5	51,1 ± 8,9	47	additív
0,75	0,5	0,25	45,6 ± 3,6	49	additív
1	0,25	0,75	60,9 ± 4,5	50	szinergizmus
1	0,5	0,5	62,3 ± 5,6	50	szinergizmus
1	0,75	0,25	60,4 ± 4,2	50	szinergizmus

16. táblázat folytatása

C (TE)			Prolif. Inh. (%)		Együttes hatás
Keverék	Dik	Met	Mért	Prediktált	
1,25	0,25	1	67,3 ± 2,3	64	additív
1,25	0,5	0,75	74,7 ± 9,1	72	additív
1,25	0,75	0,5	76,9 ± 4,5	74	additív
1,25	1	0,25	78,0 ± 3,3	70	szinergizmus
1,5	0,5	1	84,5 ± 2,4	79	szinergizmus
1,5	0,75	0,75	88,5 ± 2,0	84	szinergizmus
1,5	1	0,5	91,1 ± 1,5	83	szinergizmus
1,75	0,75	1	92,1 ± 1,3	91	additív
1,75	1	0,75	92,0 ± 3,0	93	additív
2	1	1	93,4 ± 1,4	100	antagonizmus

A *Dik + Pro* keverékeknél az additivitás és az antagonizmus váltakozva fordult elő (17. táblázat). A két leghígabb összkoncentráción (0,5 TE, 0,75 TE) az additivitás, a legtöményebbekben (1,75 TE és 2 TE) az antagonizmus érvényesült. A közepes összkoncentrációknál (1 TE, 1,25 TE, 1,5 TE) mindkettő előfordult.

17. táblázat: A *Dik + Pro* hatóanyag-pár keverékeiben megfigyelt együttes hatások

C (TE)			Prolif. Inh. (%)		Együttes hatás
Keverék	Dik	Pro	Mért	Prediktált	
0,5	0,25	0,25	10,4 ± 14,3	24	additív
0,75	0,25	0,5	32,0 ± 14,9	39	additív
0,75	0,5	0,25	22,5 ± 19,0	39	additív
1	0,25	0,75	50,1 ± 15,2	50	additív
1	0,5	0,5	42,4 ± 8,6	50	additív
1	0,75	0,25	22,8 ± 9,9	50	antagonizmus
1,25	0,25	1	65,1 ± 14,0	64	additív
1,25	0,5	0,75	59,0 ± 16,0	68	additív
1,25	0,75	0,5	52,3 ± 2,9	66	antagonizmus
1,25	1	0,25	47,3 ± 8,8	60	antagonizmus
1,5	0,5	1	67,1 ± 8,1	79	antagonizmus
1,5	0,75	0,75	64,6 ± 3,2	79	antagonizmus
1,5	1	0,5	62,2 ± 14,9	75	additív
1,75	0,75	1	72,6 ± 4,1	91	antagonizmus
1,75	1	0,75	69,2 ± 1,8	89	antagonizmus
2	1	1	73,5 ± 12,4	100	antagonizmus

Az *Ibu + Met* kombinációkban hasonlóan az előbbiekhöz, alacsony összkoncentrációkon (0,5 TE, 0,75 TE) teljesült az additivitás, a magas összekoncentrációknál (1,5 TE, 1,75 TE, 2 TE) pedig antagonizmust tapasztaltunk. A köztes koncentrációknál a két típus egyaránt előfordult, de az antagonizmus volt gyakoribb (18. táblázat).

18. táblázat: *A Ibu + Met hatóanyag-pár keverékeiben megfigyelt együttes hatások*

Keverék	C (TE)		Prolif. Inh. (%)		Együttes hatás
	Ibu	Met	Mért	Prediktált	
0,5	0,25	0,25	26,0 ± 3,1	30	additív
0,75	0,25	0,5	41,5 ± 10,9	43	additív
0,75	0,5	0,25	49,5 ± 9,9	45	additív
1	0,25	0,75	47,8 ± 2,8	50	antagonizmus
1	0,5	0,5	47,6 ± 3,4	50	antagonizmus
1	0,75	0,25	47,5 ± 12,0	50	additív
1,25	0,25	1	52,4 ± 4,7	60	antagonizmus
1,25	0,5	0,75	62,3 ± 7,5	68	additív
1,25	0,75	0,5	59,3 ± 7,2	72	antagonizmus
1,25	1	0,25	62,6 ± 5,2	70	antagonizmus
1,5	0,5	1	62,9 ± 6,4	75	antagonizmus
1,5	0,75	0,75	71,2 ± 8,2	82	antagonizmus
1,5	1	0,5	68,8 ± 7,9	83	antagonizmus
1,75	0,75	1	74,2 ± 4,0	89	antagonizmus
1,75	1	0,75	76,6 ± 5,9	93	antagonizmus
2	1	1	83,4 ± 2,7	100	antagonizmus

Az *Ibu + Pro* keverékekben az előbbihez hasonló kölcsönhatás profilt tapasztaltunk, avval a különbséggel, hogy a közepes összkoncentrációjú (1 TE, 1, 25 TE) elegyekben az *Ibu + Met* oldatokhoz képest gyakoribb volt az additivitás. Továbbá alacsony összkoncentrációkon (0,5 TE, 0,75 TE) is előfordult antagonizmus (19. táblázat).

19. táblázat: *A Ibu + Pro hatóanyag-pár keverékeiben megfigyelt együttes hatások*

Keverék	C (TE)		Prolif. Inh. (%)		Együttes hatás
	Ibu	Pro	Mért	Prediktált	
0,5	0,25	0,25	10,4 ± 5,6	20	antagonizmus
0,75	0,25	0,5	27,7 ± 7,7	35	additív
0,75	0,5	0,25	25,6 ± 3,5	35	antagonizmus
1	0,25	0,75	46,0 ± 10,0	50	additív
1	0,5	0,5	42,4 ± 4,2	50	antagonizmus
1	0,75	0,25	35,8 ± 11,5	50	additív

19. táblázat folytatása

C (TE)			Prolif. Inh. (%)		Együttes hatás
Keverék	Ibu	Pro	Mért	Prediktált	
1,25	0,25	1	55,7 ± 12,0	60	additív
1,25	0,5	0,75	53,8 ± 9,4	64	additív
1,25	0,75	0,5	54,1 ± 10,8	64	additív
1,25	1	0,25	44,0 ± 16,3	60	additív
1,5	0,5	1	56,4 ± 8,9	75	antagonizmus
1,5	0,75	0,75	58,8 ± 7,4	78	antagonizmus
1,5	1	0,5	58,6 ± 3,8	75	antagonizmus
1,75	0,75	1	66,7 ± 12,2	89	antagonizmus
1,75	1	0,75	64,9 ± 8,0	89	antagonizmus
2	1	1	77,5 ± 6,5	100	antagonizmus

Végül a *Met + Pro kombinációnál* a 16 vizsgált keverékből mindenhol antagonizmust tapasztaltunk, kivéve 3 elegyet (0,25 TE *Met* + 0,25 TE *Pro*; 0,5 TE *Met* + 0,25 TE *Pro*; 0,5 TE *Met* + 0,5 TE *Pro*), ahol viszont additív volt az együttes hatás (20. táblázat).

20. táblázat: A *Met + Pro* hatóanyag-pár keverékeiben megfigyelt együttes hatások

C (TE)			Prolif. Inh. (%)		Együttes hatás
Keverék	Met	Pro	Mért	Prediktált	
0,5	0,25	0,25	14,3 ± 15,2	30	additív
0,75	0,25	0,5	33,9 ± 7,1	45	antagonizmus
0,75	0,5	0,25	25,0 ± 20,9	43	additív
1	0,25	0,75	27,7 ± 13,7	50	antagonizmus
1	0,5	0,5	39,6 ± 19,0	50	additív
1	0,75	0,25	19,1 ± 6,8	50	antagonizmus
1,25	0,25	1	49,2 ± 17,0	70	antagonizmus
1,25	0,5	0,75	39,6 ± 13,5	72	antagonizmus
1,25	0,75	0,5	32,7 ± 10,0	65	antagonizmus
1,25	1	0,25	33,8 ± 18,7	60	antagonizmus
1,5	0,5	1	44,7 ± 15,9	83	antagonizmus
1,5	0,75	0,75	45,9 ± 16,9	79	antagonizmus
1,5	1	0,5	54,5 ± 14,5	75	antagonizmus
1,75	0,75	1	54,5 ± 7,5	90	antagonizmus
1,75	1	0,75	47,3 ± 9,7	89	antagonizmus
2	1	1	58,4 ± 11,8	100	antagonizmus

Összegezve a koncentráció addíciós modellhez képest negatív és pozitív irányú eltéréseket is megfigyeltünk, bár szinergizmus egyedül a Dik + Met kombinációban fordult elő. Antagonizmust elsősorban a magasabb összkoncentrációjú keverékekben figyeltünk meg. Mind az additivitás, mind az antagonizmus megfigyelhető volt azonos és eltérő hatásmechanizmusú hatóanyagokból álló keverékekben is.

4.1.2.3. Gyógyszerhatóanyagok kemotaktikus hatása

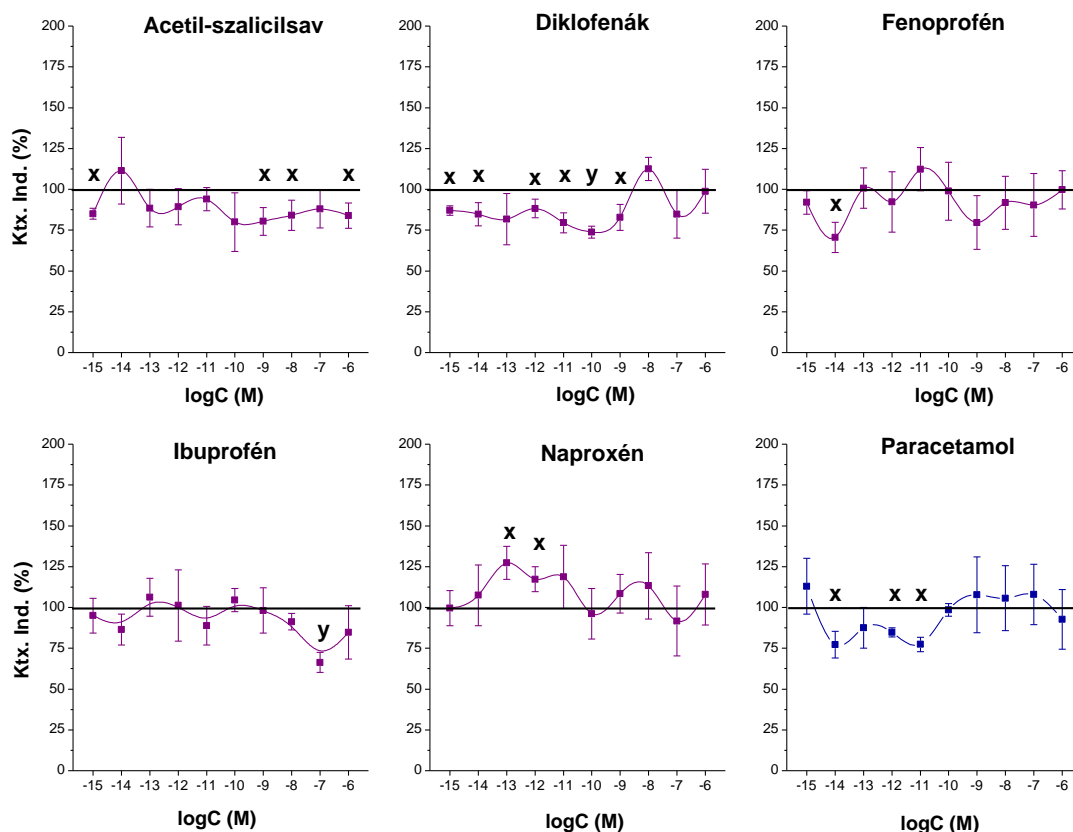
Az értekezésben tárgyalt gyógyszermolekulák migrációra kifejtett hatását ökotoxikológiai kontextusban tudomásunk szerint korábban nem vizsgálták. A szakirodalomban leírt migrációs eredmények elsősorban az *in vivo* gyógyszerhatás alátámasztásaként szerepelnek. Ebből adódóan a vizsgált koncentráció tartományok a környezetinél jóval magasabb, terápiás koncentrációknak (10^{-6} - 10^{-4} M) felelnek meg. Legtöbb esetben a hatóanyagok *in vivo* gyulladáshoz vezető reakcióban betöltött szerepét vizsgálták, valamilyen professzionális kemoattraktáns vegyületet *in vitro* alkalmazva (pl. fMLF bakteriális tripeptid, C5a, lipopoliszacharid, P-anyag stb.).

A 14 hatóanyag kemotaktikus hatását a munkacsoportunk által kidolgozott és optimalizált kétkamrás kapilláris kemotaxis assay segítségével mértük (ld. 3.3.2.), a 10^{-15} - 10^{-6} M koncentráció tartományban.

A mérési eredmények rövid összefoglalása:

Az 5 vizsgált NSAID közül a naproxén attraktáns jellegétől (10^{-13} , 10^{-12} M) eltekintve mindegyik molekula repellens volt (16. ábra). Az ibuprofén és a fenoprofén repellens hatása erősebb volt (ibuprofén: Ktx. Ind. = 70,5%; fenoprofén: Ktx. Ind. = 66,3%), ugyanakkor csak 1-1 koncentrációban volt megfigyelhető (10^{-7} M; 10^{-14} M). Ezzel szemben az acetyl-szalicilsav és a diklofenák enyhébb választ váltottak ki (Ktx. Ind. \approx 74–88%), viszont szélesebb koncentráció tartományban hatottak (diklofenák: 10^{-15} - 10^{-9} M; acetyl-szalicilsav: 10^{-15} , 10^{-9} - 10^{-6} M). Ezzel szemben a molekulacsáldból egyedülként a naproxén enyhe attraktáns karaktert (Kt. Ind. \approx 125%) mutatott 10^{-13} és 10^{-12} M koncentrációban.

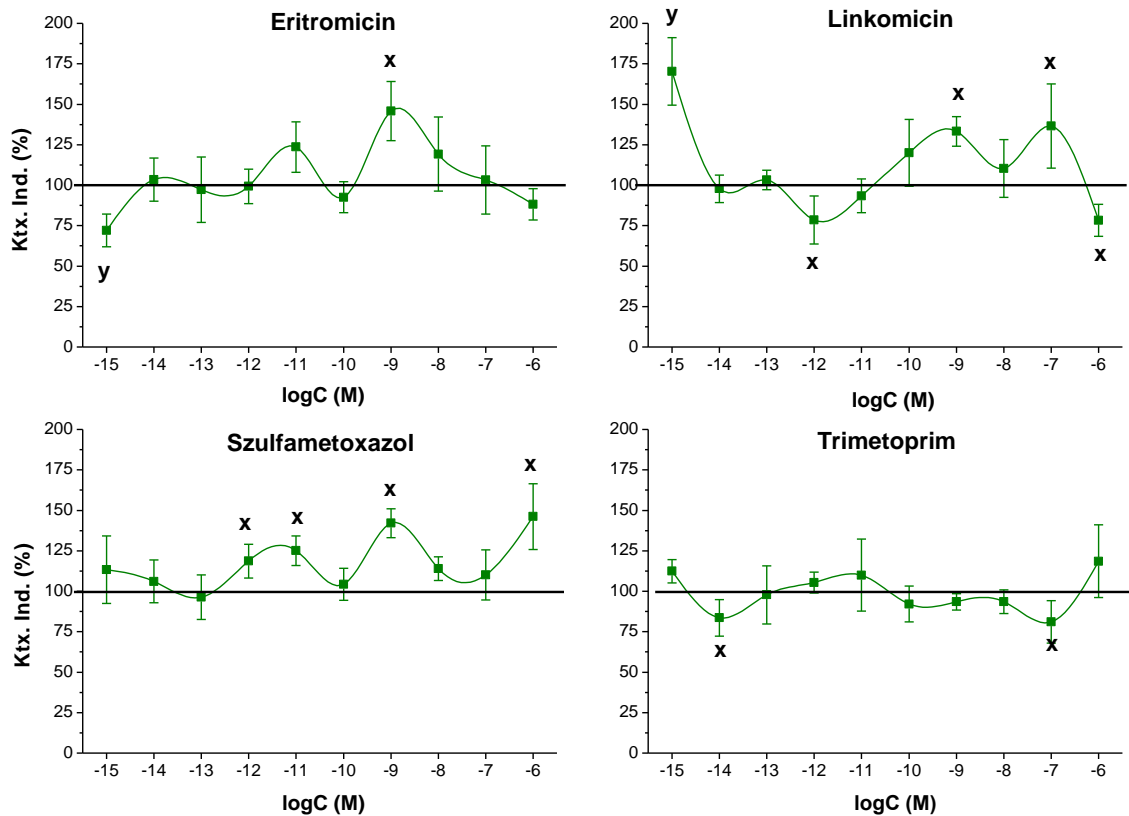
A fájdalom- és lázcsillapító paracetamol az NSAID-k többségéhez hasonlóan repellens karaktert (77,2% < Ktx. Ind. < 87,5%) mutatott viszonylag széles koncentráció-tartományban (10^{-14} - 10^{-10} M).



16. ábra: Az NSAID-k és a láz-és fájdalomcsillapító paracetamol kemotaktikus profilja

Az antibiotikumoknál az eritromicin és a linkomicin hasonló kemotaktikus profilt mutatott. Mindkét anyag koncentráción közepesen erős repellensként viselkedett: az eritromicin 10^{-15} M koncentrációban (Ktx.Ind.=72,0%), a linkomicin pedig 10^{-12} M és 10^{-6} M -on (Ktx. Ind. \approx 75%); ugyanakkor mindkét molekula enyhe attraktáns karaktert is mutatott: az eritromicin 10^{-11} M koncentrációban (Ktx. Ind. = 145,8%), míg a linkomicin 10^{-15} , 10^{-9} és 10^{-7} M koncentrációkon ($133,2\% < \text{Ktx. Ind.} < 170,2\%$). A szulfametoxazol több koncentráción (10^{-12} , 10^{-11} , 10^{-9} , 10^{-6} M) enyhe attraktáns volt ($125,1\% < \text{Ktx. Ind.} < 145,0\%$). A trimetoprim pedig a teljes koncentrációtartományban neutrálisan viselkedett (17. ábra).

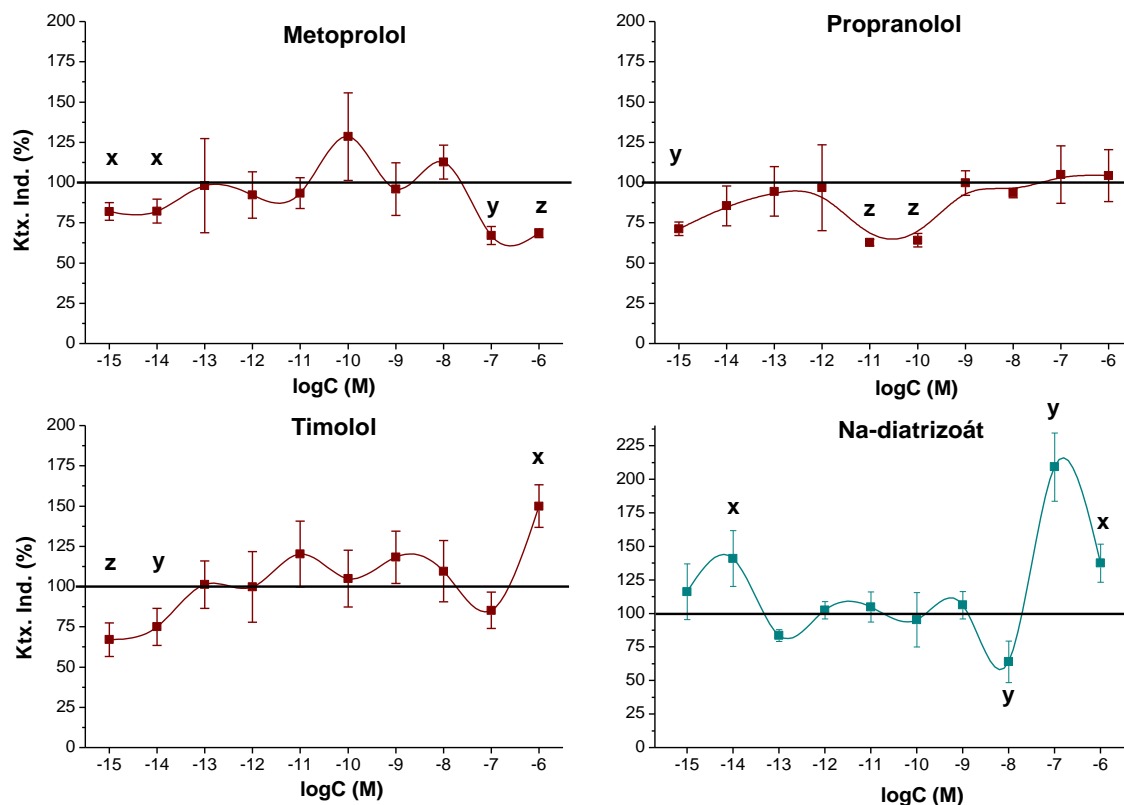
A β -adrenerg antagonisták közül a metoprolol és a propranolol erős repellens karakterrel bírtak ($62,7\% < \text{Ktx. Ind.} < 82,2\%$) viszonylag széles koncentráció tartományban (10^{-15} , 10^{-14} , 10^{-7} , 10^{-6} M, ill. 10^{-15} , 10^{-11} , 10^{-10} M). Ezzel szemben a timolol alacsony koncentráción (10^{-15} M és 10^{-14} M) repellens (Ktx. Ind. \approx 70%), magas koncentráción (10^{-7} M és 10^{-6} M) attraktáns viselkedést mutatott (Ktx. Ind. = 120,2%) (18. ábra).



17. ábra: Az antibiotikumok kemotaktikus aktivitása

A *Na-Diatrizoát* kontraszt anyag szintén kettős kemotaktikus jelleget mutatott, 10^{-13} M és 10^{-8} M-nál erős repellens ($64,0\% < \text{Ktx. Ind.} < 83,6\%$), 10^{-14} , 10^{-7} , 10^{-6} M-nál viszont attraktáns hatást váltott ki ($137,5 < \text{Ktx. Ind.} < 209,2$) (18. ábra).

Összegezve elmondható, hogy a kemotaxis a proliferáció gátlásnál érzékenyebb válasznak bizonyult, mivel előbbi esetében 1, utóbbinál 13 hatóanyag volt képes szignifikáns hatást kiváltani a környezeti szempontból releváns $< 10^{-8}$ M koncentráció tartományban. Ugyanakkor az eredmények kvantitatív elemzése egyértelműbb a proliferáció gátlási assay esetében, mivel ott a kapott koncentráció-hatás görbék monoton növekedtek. Ezzel szemben a kemotaxis mérés során tapasztalt koncentráció-válasz görbék nem monotonak, több minimumot és maximumot tartalmazhatnak.



18. ábra: A β -adrenerg antagonisták és a Na-diatrizoát kemotaktikus profilja

4.1.3. Diklofenák AOP bontásából származó minták vizsgálata

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

A diklofenákra a környezeti szennyező gyógyszereken belül is kitüntetett tudományos figyelem irányul. Ennek oka egyrészt, hogy a karbamazepin mellett a vizekben leggyakrabban detektált hatóanyag (162); másrészt a gyógyszerek közül elsőként ismerték fel ökotoxikus hatását (56). Az 1990-es években az indiai szubkontinensen őshonos bengál keselyűk (*Gyps bengalensis*) 95%-a, valamint további két faj (*Gyps indicus*, *Gyps tenuirostris*) állományának >25%-a veseelégtelenség, ill. köszvény következtében kipusztult. Ennek oka egyértelműen diklofenák mérgezés volt, amit az evvel kezelt állatok tetemeinek elfogyasztása idézett elő a keselyűkben (163; 164).

A diklofenák kb. 15%- a változatlan, 15%-a hidrolizálható metabolit, a fennmaradó 70%-a pedig inaktív formában választódik ki a vizelettel. Ezáltal jelentős mennyiségben kerül a szennyvizekbe (60). A hagyományos eleveniszapos kezelés során az elimináció

hatásfoka a műszaki jellemzőktől függően 70-80% (165), ami kiegészítő technológiák (pl. nagyhatékonyságú oxidációs eljárások (AOP-k) alkalmazásával javítható (166).

Az AOP-k szennyvizek és ivóvizek elő/utókezelésként történő alkalmazásával kapcsolatban a legjelentősebb kérdések, hogy i) toxikusak-e a keletkező fotodegradációs termékek, ill. ii) biológiai úton lebonthatóak-e (89). E szempontok – a kezelt víz rendelkezése szempontjából releváns modell organizmuson való – folyamatos monitorozása nélkülözhetetlen a gyakorlati alkalmazás megvalósításához. Továbbá a korábbi fejezetekben tárgyalt, jelenleg elérhető bioassay-k mellett szükség van, olyan új, érzékeny biotesztek kidolgozására, amelyekkel az alacsony koncentrációban jelenlévő bomlástermékek biológiai aktivitása is detektálható (89).

Ennek jegyében a Szegedi Tudományegyetem Műszaki és Anyagtudományi Intézetével együttműködésben a diklofenák egy ígéretes AOP-val, a vákuum-UV (VUV) fotolízissel történő bontását végeztük el. A kezelt minták biológiai aktivitását pedig két szempontból karakterizáltuk: i) a matematikai szempontból egyszerűbb, monton koncentráció-hatás összefüggést eredményező, de kevésbé érzékeny proliferáció gátlás szempontjából; ii) az érzékenyebb, de hormézist mutató kemotaxis szempontjából.

4.1.3.1. A diklofenák VUV fotolíziséből származó minták kémiai elemzése

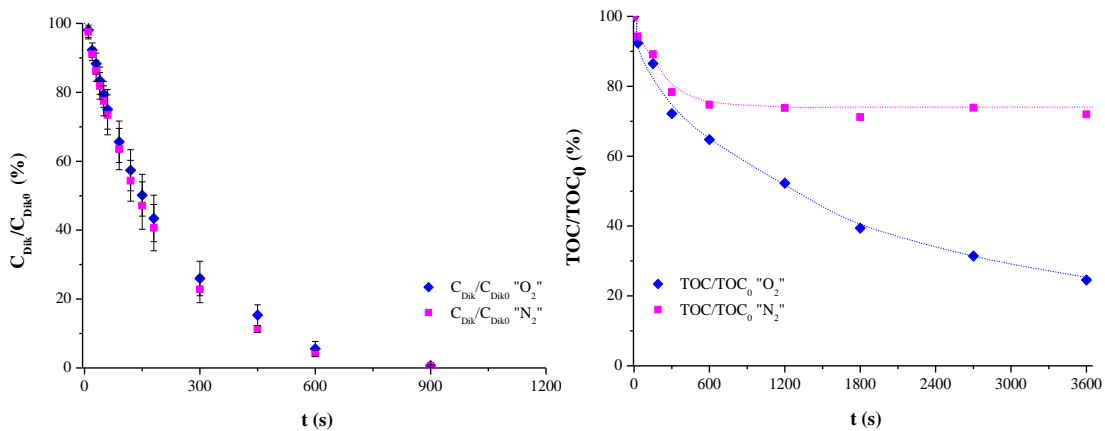
A 10^{-4} M (PBS-ben) kiindulási koncentrációjú diklofenák bontása közben két működési körülményt (O_2 -telített vs. O_2 -mentes környezet) hasonlítottunk össze (3.1.5.). A minták kémiai karakterizálása a Szegedi Tudományegyetem Műszaki és Anyagtudományi Intézetében zajlott. Ennek keretében a diklofenák bomlását és a teljes szerves széntartalom (TOC) mineralizációját követtük (19. ábra). Továbbá a keletkező bomlástermékek feltételezhető szerkezetét és mennyiségét (20. ábra) is meghatároztuk. Ezen kémiai analízis eredményeit azután összevetettük a biológiai aktivitás alakulásával.

Az eredmények rövid összefoglalása:

A diklofenák bomlási sebességében, ami pszeudoelsőrendű reakciókinetikával írható le, nem jelentkező számottevő különbség az O_2 -telített („ O_2 ”) és az O_2 -mentes („ N_2 ”) körülmény között (19. ábra). Már 600 s kezelési idő után mindkét kondíció mellett 100 %-os volt a diklofenák eltávolításának hatásfoka.

A mineralizáció tekintetében jelentős különbség mutatkozott a két bontási körülmény eredményeiben, különösen a 600 s-nál hosszabb kezelési időknél. A „ N_2 ” mintáknál a

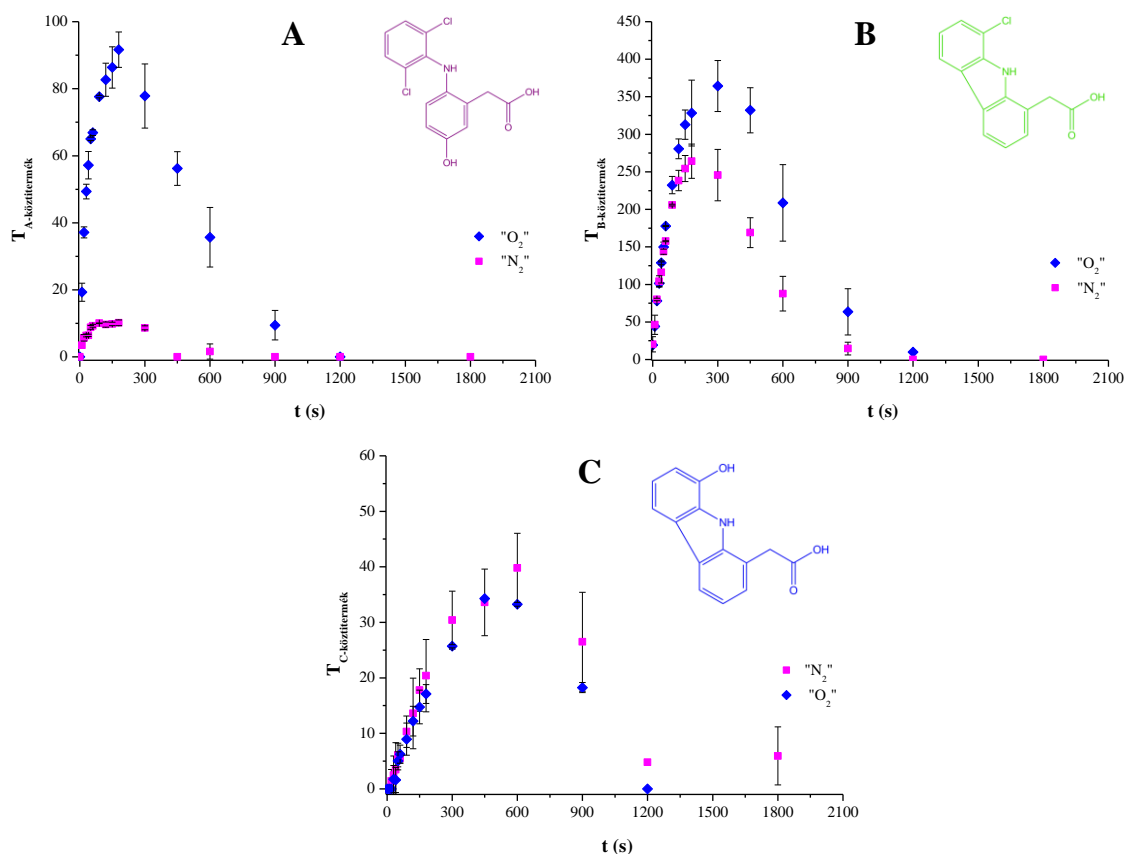
mineralizáció értéke 600 s után 30 % körül stagnált, ezzel szemben az „O₂” mintáknál tovább csökkent és 3600 s alatt elérte a kb. 70%-ot (19. ábra).



19. ábra: A diklofenák bomlási kinetikája a kiindulási Dik koncentráció %-ában kifejezve (C_{Dik}/C_{Dik0} ; %) (bal oldal); a szerves széntartalom mineralizációjának (TOC/TOC_0) függése a kezelési időtől (jobb oldal). O₂-telített környezet: „O₂”; O₂-mentes környezet: „N₂”

A keletkező bomlástermékek szerkezeti azonosítása HPLC módszerrel UV-DAD (Diode Array Detektor) vagy tömegspektrometriás detektálás alapján történt. A diklofenák bomlása során mindkét esetben 3 fő aromás köztitermék keletkezett (A, B és C), azonban az A és B termék koncentrációja az O₂-telített környezetben magasabb volt, míg a C terméké megegyezett az O₂-telített és O₂-mentes miliőben (20. ábra).

Az A termék - tömegéből és UV spektrumából adódóan valószínűleg a diklofenák hirdoxil származéka, legvalószínűbb szerkezete az 5-hidroxi-diklofenák (11. ábra). A B molekula egy HCl eliminációjával jön létre, legvalószínűbb szerkezete 1-(8-kloro-karbazolil)-ecetsav (20. ábra). A C-termék a B-köztitermék Cl atomjának szubsztitúciójával keletkező 1-(8-hidroxi-karbazolil)-ecetsav (20. ábra). E három aromás köztiterméken túl, az O₂-telített környezetben, kis mennyiségben alifás savak (pl. malonsav, oxálsav) is keletkeztek.



20. ábra. a képződő A, B és C aromás köztitermékek képződési kinetikája O_2 -telített („ O_2 ”) és O_2 -mentes („ N_2 ”) környezetben. Az y-tengelyen a koncentrációval arányos görbe alatti terület (T) szerepel. A termékek feltételezett szerkezetét az inzertek mutatják.

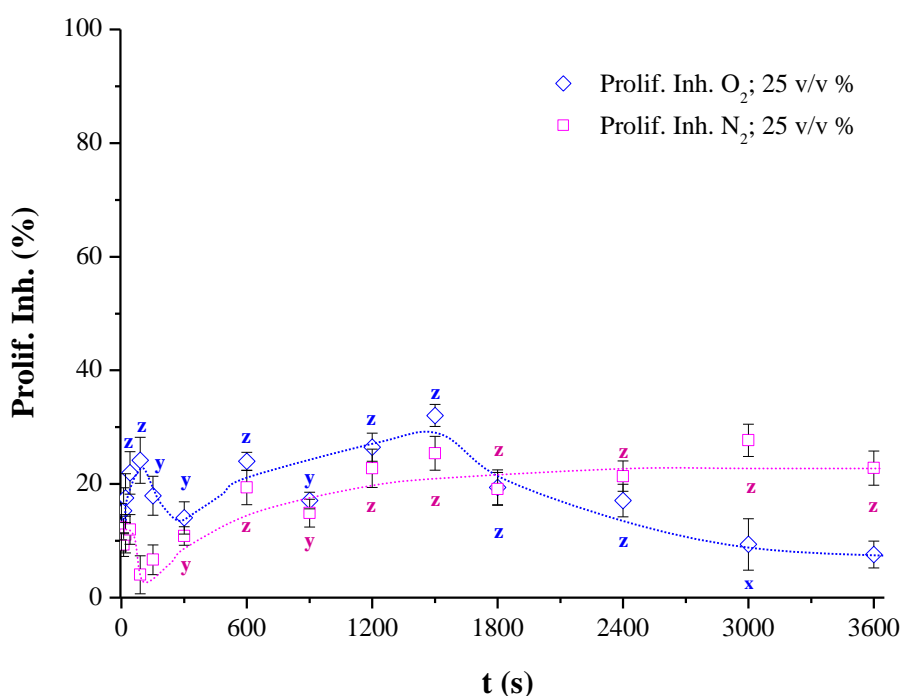
4.1.3.2. A diklofenák VUV fotolíziséből származó minták sejtbiológiai hatásai

A minták biológiai aktivitását egyrészt a *T. pyriformis* proliferációjára, másrészt migrációjára kifejtett hatás formájában értékeltük (3.3.1. és 3.3.2.). Az eredmények részletes bemutatása mindkét esetben a legtöményebb vizsgált koncentrációra vonatkozik.

Mérési eredmények rövid összefoglalása:

A proliferáció inhibíciós assayben a kezeletlen minta enyhe gátlóhatást (kb. 13%) váltott ki. Az O_2 -telített és O_2 -mentes környezetben végzett bontás közben vett minták toxicitása a kezelési időtől függően eltérően alakult (21. ábra). A kezelési idő-toxicitás görbék lefutása alapján 3 szakaszt különböztethetünk meg:

- i) A 10–300 s „O₂” minták proliferáció gátló hatása a kezeltlen mintáéhoz képest erősödött (kb. 25%-ig); ezzel szemben az „N₂” mintáké először gyakorlatilag 0%ra csökkent (90 s-os minta), majd visszatért a kiindulási 15%-os szintre.
- ii) A 600–1800 s minták proliferáció gátló hatása minkét kondíció esetén kb. 25–30% körül stagnált, az „O₂” minták értéke némileg meghaladta az „N₂” mintákét.
- iii) A 2400–3600 s intervallumban az „O₂” minták proliferáció gátló hatása egyértelmű csökkenést mutatott (3600 s-nál értéke már csak 8% volt); a „N₂” minták proliferáció gátló hatása ellenben nem változott számottevően.



21. ábra: Az O₂-telített („O₂”) és O₂-mentes („N₂”) környezetben végzett VUV fotolízis közben vett minták proliferáció gátló hatása a kezelési idő függvényében

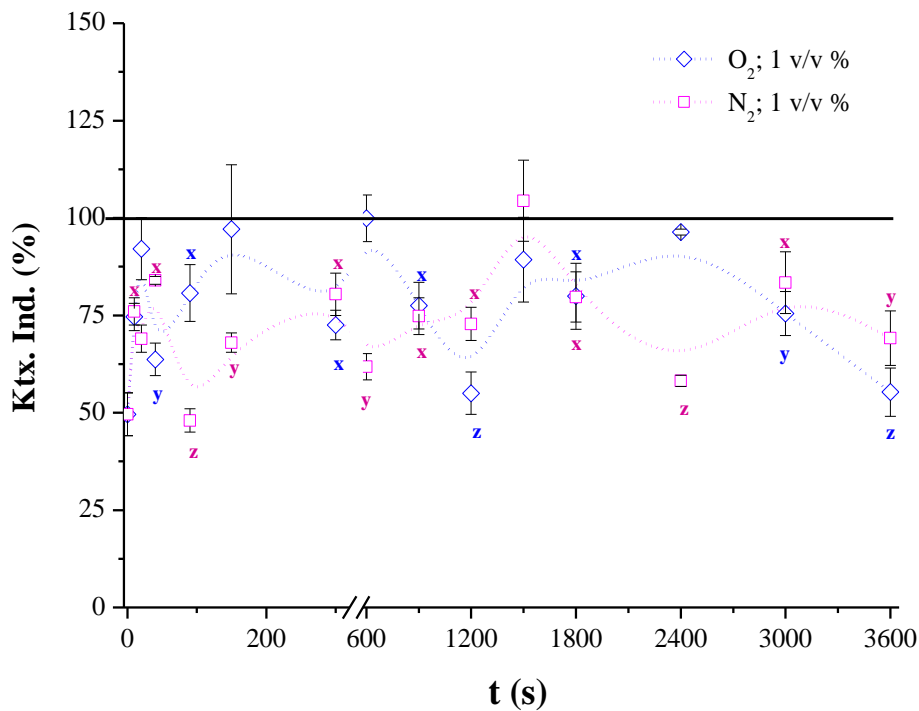
A porilferáció gátlás *koncentráció függésével* kapcsolatban elmondható, hogy a minták 5 v/v%-os hígításainál a fentiekhez hasonló trendet figyelhattunk meg, ám a tapasztalt hatások gyengébbek voltak. Az 1 v/v%-os hígítás mellett az „O₂” és „N₂” sorozatban már csak 2 (1200 és 1500 s), ill. 3 minta (1200, 3000 és 3600 s) hatása bizonyult szignifikánsnak (21. Táblázat).

21. táblázat: Az O₂-telített és O₂-mentes környezetben végzett fotolízisből származó minták proliferációra gyakorolt hatásának koncentrációfüggése

t (s)	„O ₂ ”			„N ₂ ”		
	1 v/v%	5 v/v%	25v/v%	1 v/v%	5 v/v%	25v/v%
	Prolif. vált. (%)*	Prolif. vált. (%)	Prolif. vált. (%)	Prolif. vált. (%)	Prolif. vált. (%)	Prolif. vált. (%)
0	+6,7	-10,0^x	-12,4^x	+6,7	-10,7^x	-12,4^x
10	+7,2	-11,2^x	-15,3^x	-8,5	-10,1^x	-10,5^x
20	+1,1	-11,1^x	-17,5^x	-7,2	-10,5^x	-11,1^x
40	+5,5	-14,4^x	-22,0^y	-3,5	-12,8^x	-12,0^x
90	-1,9	-17,1^y	-24,2^z	-3,7	-3,9	-4,1
150	+0,8	-14,8^x	-18,0^y	+0,4	-9,9	-6,7
300	-2,0	-13,0^x	-14,0^x	-2,0	-1,1	-10,8^x
600	-2,9	-8,5	-24,0^z	-8,8	-19,3^y	-19,4^y
900	-4,0	-11,8^x	-17,1^x	-6,0	-9,3	-14,9^x
1200	-10,1^x	-17,0^y	-26,5^z	-15,6^x	-22,0^z	-22,8^z
1500	-12,8^x	-16,4^x	-32,1^z	-5,0	-18,3^y	-25,4^z
1800	-3,9	-6,7	-19,4^y	-3,9	-12,0^x	-19,1^y
2400	-2,6	-13,4^x	-17,1^x	-9,1	-16,1^x	-21,4^z
3000	-5,0	-7,4	-9,4	-12,9^x	-13,1^x	-27,7^z
3600	-3,7	-5,8	-7,6	-13,5^x	-16,1^x	-22,8^z

* „-” előjel: proliferáció gátlás; „+” előjel: proliferáció növelés

A kemotaxis szempontjából a kezeletlen minta (1 v/v %) erőteljes repellens hatásának bizonyult (Ktx. Ind. = 50,0%) (22. ábra). Ez a repellens jelleg a teljes vizsgált koncentráció tartományban tapasztalható volt (47,6% < Chtx. Ind. < 79,0%) (Függelék 1. és 2. táblázat). A kiindulási vegyület repellens karakterét a bomlás során keletkező termékek a kezelt mintákban megőrizték, amelyek 1 v/v%-os hígításban mind az O₂-telített, mind az O₂-mentes kondíció esetében változó erősségű repellens hatást mutattak (48,0% < Ktx. Ind. < 84,0%). Ez alól kivételt jelentett néhány neutrális hatású minta (az O₂-telített minták közül a 150 s-os és 2400 s-os, az O₂-mentesek közül az 1500 s-os). Bár a kezeletlen minta kezdeti erőteljes repellens hatása a kezelési idővel csökkent, az 3600 s-os minták szintén szignifikáns repellens választ váltottak ki mind a két vizsgált kondíció esetében („O₂”: Ktx. Ind. = 55,3%; „N₂”: Ktx. Ind. = 69,1%,).



22. ábra: Az O₂-telített („O₂”) és O₂-mentes („N₂”) környezetben végzett fotolízis közben vett minták kemotaktikus hatása a kezelési idő függvényében

Összegezve elmondható, hogy a mind kémiai, mind a biológiai aktivitás szempontjából számottevő különbség mutatkozott az O₂-telített és O₂-mentes környezetben végzett bontásból származó minták között. Az O₂-telített miliőben végzett bontás 3600 s kezelési idő mellett hatékonyabb volt a diklofenák és aromás bomlástermékeinek konverziójában semleges molekulákká, amit a proliferáció gátlás assay eredményei is tükröznek. Ugyanakkor, még 3600 s besugárzást követően is, a kiindulási vegyületéhez hasonló, szignifikáns kemorepellens hatást tapasztaltunk (a legtöményebb, 1 v/v% hígítás mellett) mind a két vizsgált körülmény esetében.

4.2. Sejtvonalakon végzett vizsgálatok

Munkánk második szakaszában a gyógyszerhatóanyagok sejtviabilitásra és migrációra kifejtett hatását a 3.2.2.-3.2.4. pontban ismertetett három eltérő eredetű humán sejtvonala (HaCaT, HepG2, MCF7) alkalmazásával vizsgáltuk. Emellett a durotaxis kísérletek eredményeinél bemutatásra kerülnek az ilyen irányú vizsgálatokban referenciának számító 3T3 egér fibroblaszt sejtvonalon mért eredmények is.

4.2.1. Vízi szennyező gyógyszermolekulák hatása a sejtviabilitásra

A leggyakoribb vízi szennyező gyógyszerhatóanyagok sejtvonalakra gyakorolt *in vitro* citotoxikus hatását jellemző EC_{50} értékek tipikus nagyságrendje az irodalomban a környezeti koncentrációt több nagyságrenddel meghaladó 0,1–1 mM. E tartomány független a vizsgált sejtek változatos eredetétől (pl. hal (167; 168), rágcsáló (169; 170), humán (106; 170)), vagy akár az alkalmazott viabilitási assay típusától (pl. MTT, neutrál vörös felvétel, AlamarBlue, stb.). Ebből adódóan az irodalomban egységes álláspont, hogy a környezeti szennyező gyógyszerek citotoxikus hatása kevésbé függ az alkalmazott modellsejt típusától („baseline toxicity concept”), valamint, hogy akut toxikus hatásuk a gerinces élőlényekre a vízi környezetben kizárható. Ugyanakkor az irodalomban felelhető eredmények ellentmondásosak pl. az assay expozíciós idejének és érzékenységének kapcsolatát illetően, továbbá a sejtvonala alapú citotoxikcitási assay protozoonokkal való összevetésben is. Kísérleteinkkel többek között e kérdések vizsgálatát céloztuk.

4.2.1.1. A modell sejt és az expozíciós idő kihatása a mitokondriális szukcinát-dehidrogenáz (MTT) assay érzékenységére

A sejtviabilitás vizsgálatában klasszikusnak számító MTT assayt a 3.4.1. fejezetben leírt módon végeztük el a 3 humán sejtvonalon 24 h, 48 h vagy 72 h kezelési időt alkalmazva. A sejtvonalak kb. 24 h generációs idejét figyelembe véve elmondható, hogy míg a 24 órás kezelés eredményei inkább az akut citotoxikus hatást tükrözik, addig a 48 órás és 72 órás expozíció mellett inkább a proliferáció befolyásolásában megnyilvánuló kumulatív sejtbiológiai hatásokról kapunk képet.

Mérési eredmények rövid összefoglalása:

Az NSAID-k közül a Tetrahymenához hasonlóan a HaCaT és az MCF7 sejtvonalnál is a diklofenák bizonyult a legtoxikusabbnak, míg a HepG2 sejtvonalon a fenoprofén (22. táblázat). A kapott EC_{50} értékek alapján a csoportban található 5 molekulából 4-re a HepG2 máj eredetű sejtvonala volt a legérzékenyebb. A diklofenákra pedig a HaCaT keratinocita adta a legérzékenyebb választ. Ugyanakkor a 3 sejtvonala EC_{50} értékeinek összehasonlításából kitűnik, hogy ezek között nincsenek nagyságrendi különbségek. Legjelentősebb eltérés az ibuprofén és a naproxén 48 órás és 72 órás EC_{50} értékei között

tapasztalható, ahol a legérzékenyebb, a HepG2 sejtvonal EC_{50} értéke kb. 4-szerese a legkevésbé érzékeny sejtének. Emellett az EC_{50} értékek a kezelési idő növekedésével párhuzamosan enyhén csökkentek. Ez alól csak a naproxén volt kivétel a HaCaT sejteknél, továbbá az acetilsavnál az oldhatóság által megszabott legtöményebb koncentrációjú oldat hatása sem érte el az 50%-ot, egyik időpontban sem.

A láz- és fájdalomcsillapító paracetamolnál az EC_{50} értékek időbeni alakulása eltérő volt a 3 sejtvonalnál. Érdekes módon a 72 h expozíciós idő mellett az MCF7 sejtek bizonyultak e szer hatására a legérzékenyebbnak; ezt semelyik másik molekulánál nem tapasztaltuk.

22. táblázat: A 14 vizsgált hatóanyag MTT assay-vel meghatározott EC_{50} értéke a 3 humán sejtvonalon 24, 48 vagy 72 h expozíciós időt alkalmazva

	EC ₅₀ (mM)								
	HaCaT			HepG2			MCF7		
	24 h	48h	72h	24 h	48h	72h	24 h	48h	72h
<i>AcSz</i>	>1,5*			>1,5			>1,5		
<i>Dik</i>	0,90	0,81	0,50	0,95	0,95	0,95	1,0	0,95	0,87
<i>Fen</i>	1,5	1,3	1,1	0,73	0,64	0,69	2,0	1,2	1,0
<i>Ibu</i>	4,3	3,7	3,3	1,2	1,6	1,1	> 5,0	2,0	2,0
<i>Nap</i>	4,9	4,9	4,9	> 2,0	1,5	1,1	> 5,0		
<i>Par</i>	> 6,0	1,5	2,8	> 4,0	4,0	2,0	> 4,0	1,8	1,6
<i>Eri</i>	0,67	0,67	0,60	1,0	1,0	1,0	1,6	1,0	1,0
<i>Lin</i>	>5,0			>2,0			>2,0		
<i>Szul</i>	>2,0			>1,5			>1,5		
<i>Trim</i>	1,3	1,3	1,1	2,0	1,5	1,0	> 3,0	3,0	2,0
<i>Met</i>	>1,0	>1,0	1,0	0,97	0,97	0,97	> 2,0	1,7	1,3
<i>Prop</i>	0,1	0,1	0,1	0,15	0,15	0,15	0,27	0,21	0,21
<i>Tim</i>	>1,0	>1,0	>1,0	> 2,0	1,2	1,2	> 2,0	> 2,0	2,0
<i>Na-dia</i>	>5,0			>2,0			>2,0		

*Szürke szín: az anyag az oldhatósága által megszabott legtöményebb oldatban sem okozott 50%-os gátlást

Az antibiotikumok közül az eritromicin és a trimetoprim váltott ki szignifikáns citotoxikus hatást a vizsgált koncentrációtartományban. Mindkét szerre a HaCaT keratinociták bizonyultak a legérzékenyebbnak. Az EC_{50} érték a kezelési idő előre haladtával vagy stagnált (pl. HepG2: eritromicin), vagy enyhén csökkent (pl. HaCaT:

trimetorpin). Esetleg a két eset kombinációban fordult elő (pl. HaCaT, MCF7: eritromicin).

A β -adrenerg antagonistákra a propranolol kivételével a HepG2 sejtek reagáltak legérzékenyebben. Hasonlóan a csillós modellen mért eredményekhez (4.1.2), mind a 3 sejtvonalon a propranolol bizonyult a leghatásosabbnak a 14 vizsgált molekula közül, amelynek EC_{50} értéke átlagosan 1 nagyságrenddel kisebb a többi komponenséhez képest. A β -blokkolóknál az assay érzékenysége általában nem növekedett az expozíciós idő növelésével, bár az MCF7 sejteknél a metoprolol és a propranolol esetében tapasztaltunk némi csökkenő tendenciát az EC_{50} értékekben.

A *Na-diatrizoát* kontrasztanyag az egysejtű modellen mért eredményekhez hasonlóan egyik sejtvonalon sem váltott ki szignifikáns toxikus hatást a vizsgált koncentráció tartományban, még a leghosszabb kezelési idő alatt sem.

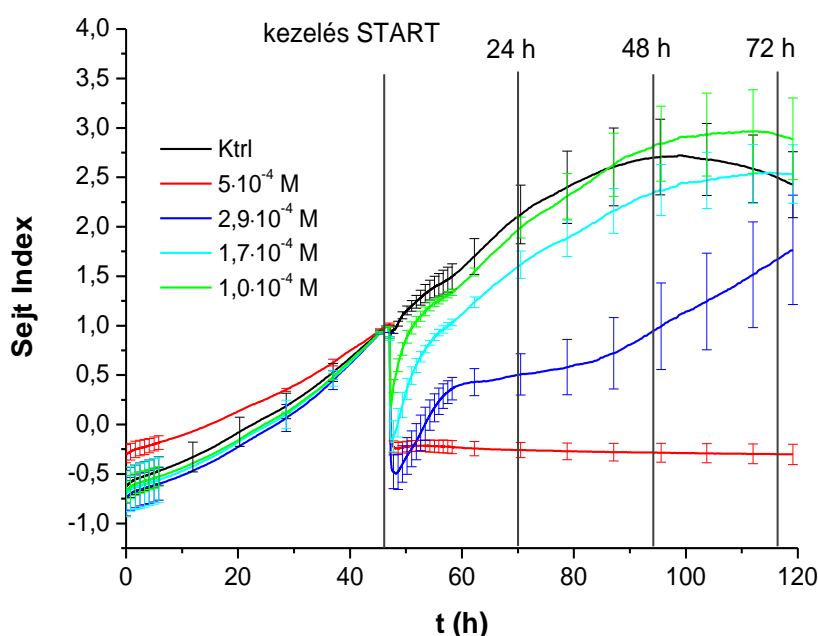
Összegezve elmondható, hogy a legtöbb pontban a HepG2 sejtvonal bizonyult a legérzékenyebbnek, a fennmaradó esetekben pedig a HaCaT keratinocita. Ugyanakkor a tapasztalt EC_{50} értékek között egyik esetben sem mutatkozott nagyságrendi eltérés. Továbbá általában az adott molekula családon belül a toxicitás relatív sorrendje mind a 3 sejtvonalon megegyezett. Kevés kivételtől eltekintve az EC_{50} értékek általában az expozíciós idővel nem, vagy csak kis mértékben csökkentek.

4.2.1.2. Impedimetria alapú, valós idejű sejtvialitás mérés alkalmazhatóságának vizsgálata szelektált hatóanyagokkal

Az MTT assay eredményei alapján a legérzékenyebb HepG2 sejtvonalon legtoxikusabb 3 vízoldható hatóanyagot választottuk ki az xCELLigence rendszerben végzett impedimetria alapú viabilitás vizsgálatainkhoz. Fokozott érzékenysége mellett a módszernek a klasszikus végpont assay-khez képest jelentős előnye, hogy a viabilitás valós időben történő követése értékes plusz információkkal szolgálhat pl. a toxikus hatás reverzibilis voltáról, vagy kinetikájáról. Kísérleteink célja i) egyrészt a koncentráció-hatás görbék felállítása volt az MTT módszer alapján meghatározott, viszonylag tömény (10^{-5} – 10^{-3} M) gyógyszer oldatokat alkalmazva; ii) másrészt a környezeti szempontból releváns (10^{-12} - 10^{-8} M) koncentrációjú oldatok esetleges adhézió befolyásoló hatását is tesztelni kívántuk.

Mérési eredmények rövid összefoglalása:

A 10^{-5} - 10^{-3} M alkalmazott hatóanyagok mind a három sejtvonalon egyértelműen azonnali toxikus hatást eredményeztek, amelyet a 23. ábra a propranolol példáján mutat be a HaCaT sejteken. A növekvő koncentrációjú oldatokkal végzett kezelések hatására a Sejt Index által reprezentált impedancia értékek drasztikus csökkenése következett be, jelezve, hogy az elektródra kitapadt sejtek morfológiájában, vagy viabilitásában változás állt be. A 10^{-4} M és $1,7 \cdot 10^{-4}$ M töménységű oldatoknál e hatás reverzibilisnek bizonyult, tehát feltehetően morfológia változásból adódott. Ugyanakkor a $2,9 \cdot 10^{-4}$ M és $5 \cdot 10^{-4}$ M koncentrációjú oldatok Sejt Index görbéi végig jelentősen a kezeletlen görbe alatt haladtak, jelezve, hogy irreverzibilis citotoxikus hatás alakult ki.



23. ábra. A hatóanyagok koncentrációfüggő azonnali citotoxikus hatását jellemző tipikus impedancia görbék – a propranolol és HaCaT sejtek példáján bemutatva

Bár az impedimetriás görbékből kinyert adatokra nem minden esetben lehetett megfelelő pontossággal ($R^2 \geq 0,98$) koncentráció-hatás görbét illeszteni, mindhárom sejtvonalon, mindhárom anyag esetében az MTT módszerrel meghatározott EC_{50} értékeknél lényegesen alacsonyabb, kb. fele akkora értékeket kaptunk (23. táblázat).

Az anyagok relatív toxicitása, azaz az anyagok toxicitási sorrendje mind a három sejt esetében az MTT módszerrel kapott eredménnyel megegyező. Az EC_{50} adat időfüggésével kapcsolatban elmondható, hogy az egyes időpontok közötti különbségek,

ahol ez meghatározható, a 20%-ot nem haladják meg. Tehát az általánosságban az EC_{50} az expozíciós idővel nem változott jelentősen.

23. táblázat: A kiválasztott 3 hatóanyag xCELLigence impedimetriás módszerrel meghatározott EC_{50} értékei 24 h, 48 h vagy 72 h expozíciós időt követően

	EC ₅₀ (mM)								
	HaCaT			HepG2			MCF7		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
<i>Dik</i>	0,28	0,22	0,23	0,46	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	0,38
<i>Met</i>	n.m.	n.m.	0,78	0,46	0,42	0,41	n.m.	n.m.	0,80
<i>Pro</i>	0,25	0,28	0,34	0,064	0,061	0,066	0,13	0,15	0,17

n.m.: A mért adatokra nem lehetett szigmoid koncentráció-hatás görbét illeszteni a megfelelő pontossággal ($R^2 \geq 0,98$)

Ugyanakkor a környezeti szempontból releváns koncentráció tartományban (10^{-12} M - 10^{-8} M) alkalmazott gyógyszerek egyik sejtvonalon sem fejtettek ki számottevő hatást (24. táblázat) a sejtek adhéziójára/viabilitására 24h, 48h és 72 h expozíciót követően.

24. táblázat: A 3 hatóanyag hatása a sejtek impedanciájára a 24h, 48h és 72 h inkubációs idő alatt, a kezeletlen kontroll %-ában kifejezve

C	(nM)	norm.SI _{atl} (%) ± SD								
		HaCaT			HepG2			MCF7		
		24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
Dik	0,004	100,4 7,1	101,4 7,9	101,6 7,3	102, 1,6	104,9 1,9	108,5 3,3	114,9 13,0	116,6 11,0	110,5 8,1
	0,2	97,9 10,2	98,9 13,6	99,4 12,8	101,8 1,1	103,8 2,1	106,6 3,5	103,7 20,0	109,6 14,9	108,0 11,8
	10	98,8 1,2	101,9 1,8	103,2 2,6	98,9 1,5	100,1 1,9	102, 3,5	109,1 4,4	111,1 3,6	106,2 2,8
Met	0,004	100,0 1,4	102,8 2,9	103,6 4,7	100,6 4,9	104,7 6,9	109,5 6,2	109,5 1,4	113 1,3	107,8 1,2
	0,2	102,5 7,2	105,5 8,0	106,6 7,0	100,0 1,2	103,6 2,8	107,8 2,4	100,0 17,4	105,5 11,5	104,6 9,9
	10	95,6 1,1	97,2 0,9	100,2 0,9	99,1 1,8	100,9 2,5	104,2 1,9	90,0 20,0	92,5 20,0	95,5 15,4
Pro	0,004	92,2 7,6	91,1 10,0	92,2 13,6	100,1 3,3	103,3 2,8	106,3 3,1	89,9 17,7	93,2 8,6	95,6 5,8
	0,2	105,3 11,3	108 15,3	108,3 14,3	101,8 3,7	102,0 8,9	101,3 15,6	104,8 18,8	105,9 15,6	105,6 16,1
	10	94,5 10,4	94,6 14,0	95,7 13,0	100,7 4,1	100,1 9,1	98,4 14,7	96,4 19,6	99,5 15,5	101 13,7

Összegezve elmondhatjuk, hogy a 3 hatóanyag a környezeti szempontból releváns koncentrációtartományban nem módosította egyik vizsgált sejtvonal adhézióját sem, azonban a töményebb oldatok azonnali citotoxikus hatást váltottak ki. Az impedimetria alapú viabilitás mérés eredményei az MTT módszerrel jó egyezést mutattak a relatív toxicitás tekintetében, az érzékenység szempontjából pedig a meg is haladták az utóbbit.

4.2.2. Szelektált gyulladáscsökkentők és β -blokkolók hatása a migrációra

Ahogy a 4.1.2.3. fejezetben szerepelt, a Tetrahymenánál a kemotaxis a proliferációnál érzékenyebb sejtelettani válasznak bizonyult. Így a gyógyszerek túlnyomó többségénél még az igen alacsony, környezeti szempontból releváns koncentráció tartományban is sikerült szignifikáns kemotaktikus választ detektálni. Ez felvetette a humán sejtvonalak hasonló irányú vizsgálatának lehetőségét, amelynek során egyben két új, innovatív technika (ECIS „electric fence”, ill. durotaxis assay) alkalmazhatóságát is tanulmányoztuk.

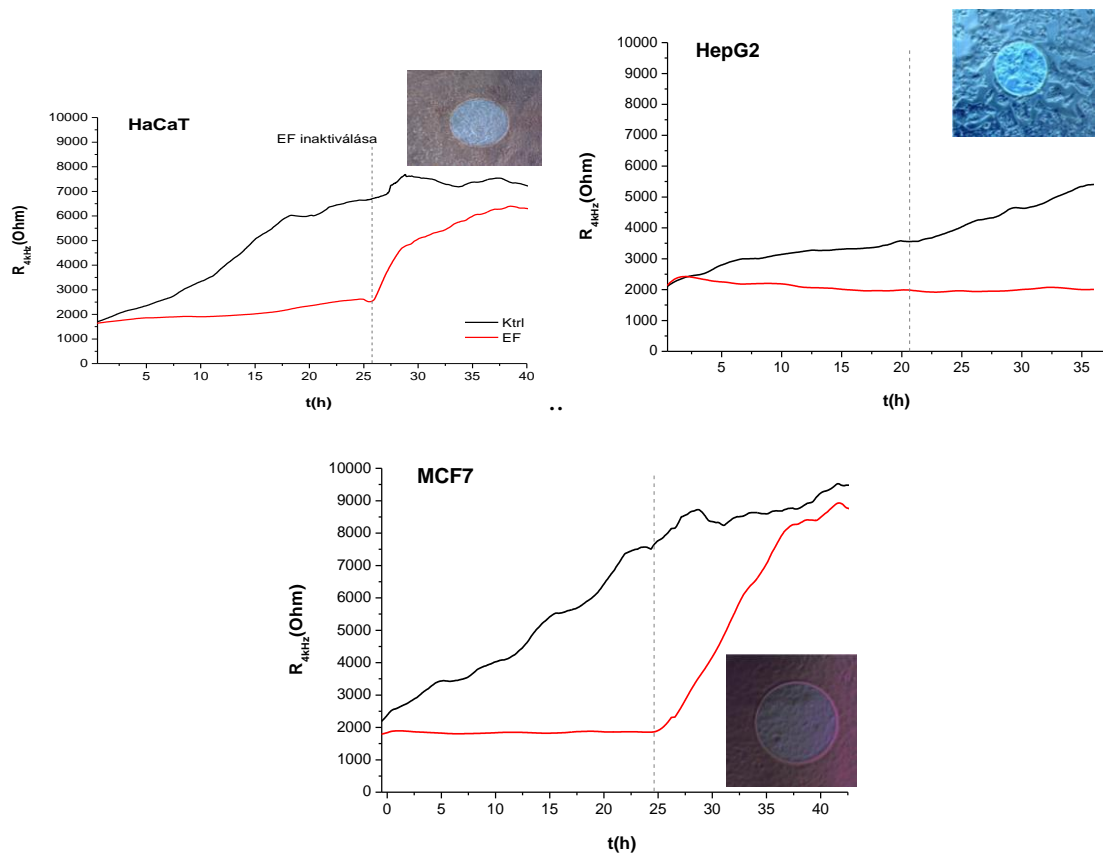
4.2.2.1. Az ECIS „electric fence” technika alkalmazhatóságának vizsgálata

Az ECIS készülék „electric fence” (EF) opciójával (ld. 3.4.3.2.) végzett kísérleteink elsődleges célja a 3 humán sejtvonal adhéziós és migrációs viselkedésének karakterizálása volt. Emellett a módszer beállításához a 4.2.1.2. pontban vizsgált 3 kiválasztott hatóanyagot alkalmaztuk, amelyeknek migrációt befolyásoló hatását a környezeti szempontból releváns legmagasabb, 10^{-8} M-os koncentrációban vizsgáltuk.

Mérési eredmények rövid összefoglalása:

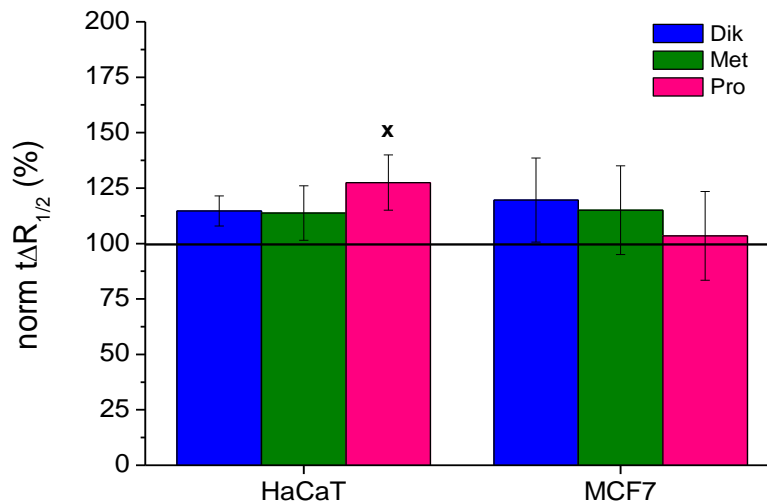
A kapott impedimetriás görbék, valamint a mikroszkópban az elektród felszínekről készített felvételek alapján a 3 sejtvonal közül kettő, a HaCaT és az MCF7 alkalmas alanyoknak tűntek az EF funkcióval végzett migrációs vizsgálatokhoz (24. ábra). A HepG2 sejteknél viszont az EF kikapcsolását követő néhány órában elmaradt a várt ellenállás emelkedés, amit sejtek többretegű szigetekben való elhelyezkedésével magyarázhatunk (24. ábra).

Ebből adódóan a 4.2.1.2. pontban is vizsgált 3 hatóanyag migrációt befolyásoló hatását a HaCaT és az MCF7 sejteken vizsgáltuk. Míg az MCF7 esetében egyik hatóanyag sem módosította szignifikánsan a migráció kinetikáját, a HaCaT sejteken a propranolol enyhén növelte az elektród benövéséhez szükséges időt, tehát a migráció kinetikáját lassította (25. ábra).



24. ábra: A 3 sejtvonal migrációja az „electric fence” (EF) funkció alkalmazásával. A fotók az elektród felszíneket a kontroll görbék maximumánál mutatják.

Összegezve elmondhatjuk, hogy a HaCaT és MCF7 sejtek alkalmasak az EF módszer alkalmazására, azonban a környezeti szennyező gyógyszerhatóanyagok az ökotoxikológiai szempontból releváns koncentrációtartományban - a propranolol HaCaT sejtekre kifejtett enyhe lassító hatásától eltekintve - nem módosították számottevően a sejtek migrációját.



25. ábra: A 3 kiválasztott hatóanyag, a diklofenák (Dik), metoprolol (Met) és proranolol (Pro) hatása a sejtmigráció sebességére (a kontroll százalékában kifejezve)

4.2.2.2. Durotaxis vizsgálatok

Kuo, C.H.R., Láng, J., Kőhidai, L., Sivaniah, E. *Substrate micropatterning: Micropatterning gradients of stiffness. in Methods in cell biology, ed. M. Piel and M. Théry, Elsevier Inc. – megjelenés alatt*

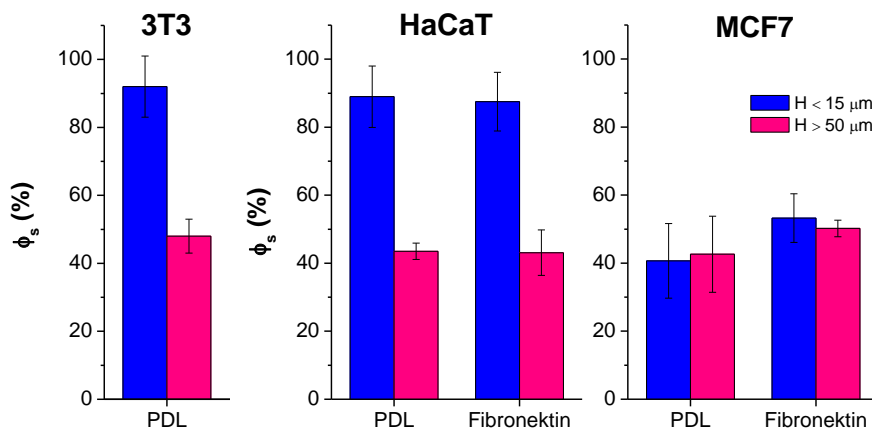
Az utóbbi időben, elsősorban a tumor terápiák fejlesztésére irányuló kutatások kapcsán, ismertté vált, hogy a sejtek gyógyszerek iránti érzékenysége függ a sejttenyésztő felszín rigiditásától (pl. MCF7 emlőkarcinóma sejtek ciszplatin-érzékenysége a szubsztrát rigiditásával párhuzamosan nőtt) (171; 172). Továbbá számtalan patológiás állapot esetében (pl. miokardiális infarktus, tumorképződés, krónikus ízületi gyulladás, stb.) ismert a sejtek mikrokörnyezetének mechanikai szempontból történő megváltozása (173-175). E két tény megalapozta a különböző hatóanyagok sejtleletani hatásainak és a mechanikai mikrokörnyezet szerepének szimultán vizsgálatára iránti igényt.

Éppen ezért alábbi vizsgálatainkkal a durotaxis szempontjából kívántuk jellemezni az általunk használt HaCaT és MCF7 sejt vonalakat. A HepG2 sejteket az ECIS migrációs kísérletekben mutatott kedvezőtlen növekedési morfológiájuk miatt e kísérleteinkben nem vizsgáltuk. A keratinocita és az emlőkarcinóma vonal esetében a gél rétegvastagságának (H) és felszíni előkezelésének (poli-D-lizin, (PDL) vagy fibronectin) szerepét vizsgáltuk (3.4.4.). Továbbá vizsgáltuk 4 a humán gyógyászatban gyakran alkalmazott, ugyanakkor gyakori vízi szennyező hatóanyag (diklofenák,

ibuprofén, metoprolol, propranolol) durotaxisra gyakorolt hatását a referencia 3T3 sejtvonalon, valamint az előbb említett előkísérletek során pozitív durotaxist mutató HaCaT sejteken. Emellett az előbbi két sejten a citoszkeletális elemek durotaxisban betöltött szerepét azok specifikus gátlószereinek (3.1.3.) alkalmazásával, indirekt módon vizsgáltuk.

Mérési eredmények rövid összefoglalása:

A 2 humán sejtvonal (*HaCaT* és *MCF7*) gélvastagság-függő durotaxisát a 3T3 egér referencia sejtvonalával összevetve azt tapasztaltuk, hogy a gél felszínén alkalmazott kezelés módjától függetlenül a *HaCaT* sejtek a 3T3-hez hasonlóan a vékonyabb gélen képesek a látszólagos rigiditás „stiffness” különbség érzékelésére és a 24 h inkubáció elteltével a gél rigidebb területein akkumulálódnak (26. ábra). Ezzel szemben az *MCF7* emlőkarcinóma sejtek a felszíni kezelés módjától függetlenül mind a vastagabb, mind a vékonyabb gélen véletlenszerűen helyezkedtek el (26. ábra).



26. ábra: Az gél felszíni előkezelésének (poli-D-lizin (PDL), vagy fibronectin) hatása a *HaCaT* és az *MCF7* sejtek rigiditás-függő megoszlására $H < 15 \mu\text{m}$ és $H > 50 \mu\text{m}$ vastagságú géleken, a rigidebb területeken található szettek %-os arányában (ϕ_s) kifejezve (jobb oldal). Bal oldal: referencia: a 3T3 sejtek eloszlása PDL kezelés mellett.

A citoszkeletális inhibitorok citotoxicitás eredményei alapján a 3T3 fibroblasztok a *HaCaT* keratinocitáknál valamivel érzékenyebbek, mivel az AlamarBlue assayben 4 molekulánál (citokalazin-B és D, falloidin, ill. kalikulin-A), az MTT assay-ben 3 molekulánál (citokalazin-B, falloidin, kalikulin-A) alacsonyabb koncentrációban jelentkezett a szignifikáns toxikus hatás a 3T3 fibroblasztokon (25. táblázat).

25. táblázat: A citoszkeletális inhibitorok toxikus hatása (Inh., %) a vizsgált koncentrációtartományon belüli legalacsonyabb hatásos koncentráción

	3T3 fibroblaszt				HaCaT keratinocita			
	AlamarBlue		MTT		AlamarBlue		MTT	
	C (μ M)	Inh. (%)	C (μ M)	Inh. (%)	C (μ M)	Inh. (%)	C (μ M)	Inh. (%)
Citokalazin-B	5	52,6 ^z	5	25,5 ^x	10	59,7 ^z	10	59,9 ^z
Citokalazin-D	1	21,0 ^x	10	28,1 ^x	>10	*	10	28,8 ^x
Falloidin	5	49,8 ^z	1	20,0 ^x	10	53,2 ^z	>10	
Kolhicin	>10		>10		> 10		> 10	
Nokodazol	>10		>10		> 10		> 10	
Blebbistatin	>10		>10		> 10		> 10	
Kalikulin-A	0,005	56,3 ^y	0,005	30,6 ^y	0,005	22,9 ^x	0,01	71,5 ^z

*Szürke háttér: a vizsgált legmagasabb koncentráción (általában 10 μ M) sem tapasztaltunk szignifikáns hatást.

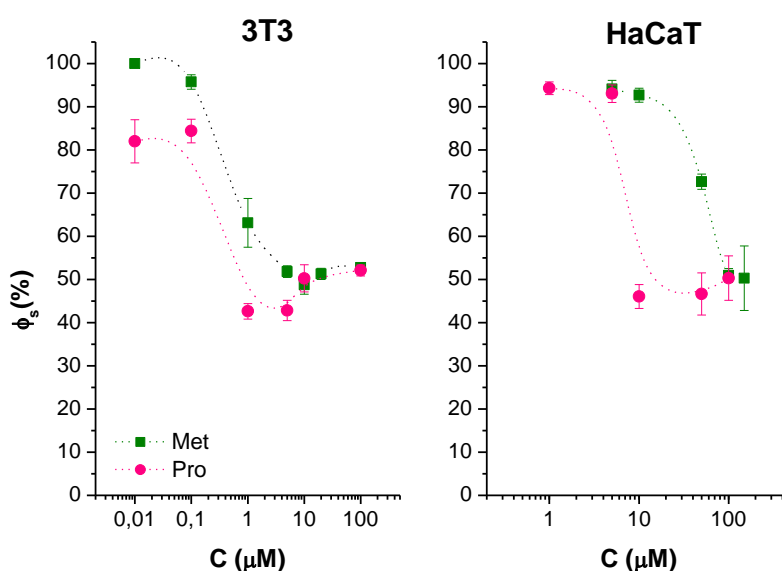
Mindkét sejtvonalon a legtoxikusabb ágensnek a kalikulin-A bizonyult, amely már 5 nM koncentrációban jelentősen csökkentette a sejtek viabilitását. Közepesen toxikusak voltak az aktinra ható inhibitorok, amelyeknek legalacsonyabb toxikus koncentrációja az 1-10 μ M tartományba esett. A legkevésbé toxikus szerek a mikrotubulusokra ható kolhicin és nokodazol, valamint a miozin inhibitor blebbistatin voltak, amelyek még 10 μ M-os koncentrációban sem okoztak szignifikáns toxicitást. Az anyagok toxikus hatását a teljes vizsgált koncentráció tartományban a Függelék 1–7. ábrája mutatja.

A *durotaxis gátlására* valamennyi citoszkeleton inhibitor képes volt (26. táblázat), s a toxicitási eredményekhez hasonlóan itt is a 3T3 fibroblasztok bizonyultak az érzékenyebb sejtnak (kivéve a citokalazin-B-t). Az anyagok relatív inhibíciós képessége szintén összhangban volt a viabilitás mérés eredményeivel: legerőteljesebb hatású a kalikulin-A volt, ezt követték az aktin inhibitorok, majd a miozin II. inhibitor blebbistatin és a mikrotubulus mérgező kolhicin. A nokodazol a toxicitási eredményektől eltérően a durotaxis gátlása szempontjából az aktin inhibitorokkal megegyező potenciált mutatott. A teljes durotaxis inhibíciót előidéző koncentráció mind a 3T3, mind a HaCaT sejteken minden molekulánál alacsonyabb volt, mint a legalacsonyabb toxikus koncentráció.

26. táblázat: A 3T3 fibroblaszt, ill. a HaCaT keratinocita durotaxisának teljes gátlását előidéző legalacsonyabb citoskeletális inhibitorok koncentrációk ($C_{\min. inh.}$)

	Minimális durotaxis gátló koncentráció ($C_{\min. inh.}$) (μM)	
	3T3 fibroblaszt	HaCaT keratinocita
Citokalazin-B	0,5	0,25
Citokalazin-D	2,5	7
Falloidin	0,75	1
Kolhicin	12	5
Nokodazol	0,75	10
Blebbistatin	4	8
Kalikulin-A	0,001	0,002

A kiválasztott 4 gyakori vízi szennyező hatóanyag közül a β -blokkoló metoprolol és propranolol mind a két sejtvonalon képes volt a durotaxis gátlására (27. ábra).



27. ábra: a metoprolol (Met) és propranolol (Pro) β -adrenerg antagonisták által kiváltott durotaxis gátlás koncentráció függése HaCaT és 3T3 sejteken

Mindkét sejtvonalon a propranolol minimális, teljes gátlást előidéző koncentrációja egy nagyságrenddel kisebb volt, mint a metoprololé. Emellett a két sejtvonal érzékenysége között is kb. egy nagyságrend eltérés adódott a 3T3 fibroblasztok javára ($C_{\min. inh. 3T3, Pro} = 1 \mu\text{M}$, $C_{\min. inh. 3T3, Met} = 10 \mu\text{M}$; $C_{\min. inh. HaCaT, Pro} = 10 \mu\text{M}$, $C_{\min. inh. HaCaT, Met} = 100 \mu\text{M}$). Ezzel szemben a diklofenák és az ibuprofén gyulladáscsökkentők egyik sejtvonal durotaxisát sem gátolták a vizsgált 10–200 μM koncentráció tartományban.

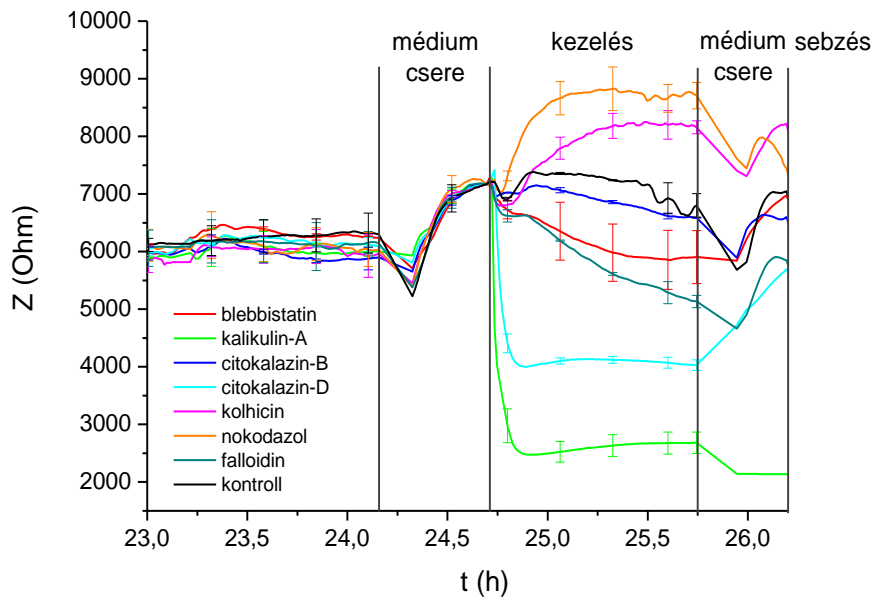
Összefoglalva elmondható, hogy a citoszkeleton inhibitorok hatását vizsgálva a durotaxis mérése a kolorimetriás viabailitási assaykhez viszonyítva érzékenyebb volt. Mindkét vizsgálatban a 3T3 sejtvonal érzékenysége meghaladta a HaCaT keratinocitáét. A 4 kiválasztott gyakori gyógyszerhatóanyag közül pedig az NSAID-k nem, viszont a β -blokkolók képesek voltak a durotaxis gátolni.

4.2.2.3. Durotaxis gátló szerek hatása a sejtadhézióra és migrációra

Mivel a durotaxis komplex sejtleletani válasz, amely egyszerre függ a sejt mechanikai ingerek iránti érzékenységétől (mechanoszenzitivitásától) és migrációs képességétől, vizsgálni kívántuk a durotaxis gátlása során tanulmányozott szerek izolált, sejt migrációjára kifejtett hatását. Ugyanakkor ennek impedimetriás detektálása lehetőséget biztosított a kezelés során bekövetkező impedanciaváltozás nyomkövetésére is, amely egyrészt a sejtek kiterültségének mértékével (az általuk lefedett elektród felszín nagyságával), másrészt az adhézió erősségével függ össze (3.4.3.). A gyógyszerek okozta adhézióbeli változást a kezelés során mért átlagos impedanciának a kezeletlen kontroll görbék átlagos impedanciájához viszonyítva (*norm. Z_{atl} , %*) fejeztük ki. A migrációt pedig az 50%-os sebgyógyulás eléréséhez szükséges idő kezeletlen kontrollhoz viszonyított arányával (*norm. $t\Delta Z_{1/2}$, %*) jellemeztük. Az index kiszámításának menetét ld. 3.4.3.2.

Mérési eredmények rövid összefoglalása:

A 3T3 sejteken valamennyi citoszkeleton inhibitor szignifikánsan csökkentette a sejtadhézió mértékét a kezelés során, ill. szignifikánsan fokozta a sebgyógyulás idejét a kezelés után végzett sebgyógyulási assay-ben (27. táblázat). A 4.2.2.2.-ben leírtakkal megegyezően a leghatásosabb molekula ebben az esetben is a kalikulin-A volt, amely már a sejtadhéziót is irreverzibilisen gátolta, így a sebgyógyulási assay-ben a sejtek migrációja egyáltalán nem volt megfigyelhető. Bár a többi molekulánál a kezelés alatti csökkent impedancia érték az anyagok eltávolítása után részben helyreállt, a falloidin, a kolhicin és a nokodazol esetében sem jött létre az 50%-os sebgyógyulás a sebzését követő 24 h-ban. Míg a másik 3 szer esetében a kontrollhoz képest szignifikánsan megnövekedett a sebgyógyulás ideje. Hasonló eredményeket tapasztaltunk a HaCaT sejteken is, két jelentős különbségtől eltekintve. Az első, hogy a kolhicin és a nokodazol mikrotubulus mérgek az adhéziót kis mértékben, de szignifikánsan növelték (28. ábra)



28. ábra: Acitoszkeleton inhibitorok hatása a HaCaT sejtek adhéziójára

A másik különbség, hogy a HaCaT sejteken a citokalazin-B és a blebbistatin kezelés nem eredményezett jelentős változást a sebgyógyulás sebességében (27. Táblázat).

27. táblázat: A citoskeletonális elemek működését gátló szerek hatása a 3T3 és HaCaT sejtek adhéziójára és migrációjára a kezeltlen kontrollok százalékában kifejezve

	3T3 fibroblaszt		HaCaT keratinocita	
	Adhézió	Migráció	Adhézió	Migráció
	<i>norm. Z_{át}</i> (% ±SD)	<i>norm. tΔZ_{1/2}</i> (%)	<i>norm. Z_{át}</i> (% ±SD)	<i>norm. tΔZ_{1/2}</i> (%)
Citokalazin-B	43,5±22,3 ^z	250,2 [*]	94,2±0,3	102,1±32,0
Citokalazin-D	29,5±15,0 ^z	330,1 [*]	42,1±5,3 ^z	216,3±44,0 ^y
Falloidin	50,1±11,7 ^z	n.m. ^{**}	71,4±2,0 ^y	261,1 [*]
Kolhicin	48,8±16,7 ^z	n.m.	114,6±0,3 ^x	383,4 [*]
Nokodazol	44,3±19,2 ^z	n.m.	121,0±6,4 ^x	468,2 [*]
Blebbistatin	87,2±3,0 ^x	150,1 [*]	77,2±3,5 ^y	95,1±28,0
Kalikulin-A	27,8±18,0 ^z	n.m.	12,9±7,8 ^z	n.m.

*Az ismételt mérések egyikében a sebgyógyulás nem érte el az 50%-ot

**A sebgyógyulás egyik mérés során sem érte el az 50%-os értéket.

A kiválasztott 4 gyakori vízi szennyező hatóanyaggal történő kezelés a sejtadhéziót egyik sejttypusnál sem befolyásolta jelentősen (28. táblázat). Ugyanakkor a sejt migrációt a diklofenák a 3T3 sejteknél jelentősen lassította, a HaCaT

keratinocitáknál viszont enyhén fokozta. A másik három hatóanyag esetében nem tapasztaltunk szignifikáns hatást.

28. Táblázat: a gyakori vízi szennyező gyógyszerek hatása a 3T3 és a HaCaT sejtvonalak adhéziójára és migrációjára a kezeletlen kontrollok százalékában kifejezve

	3T3 fibroblaszt		HaCaT keratinocita	
	Adhézió	Migráció	Adhézió	Migráció
	norm. $Z_{\text{átl}}$ (% \pm SD)	norm. $t\Delta Z_{1/2}$ (% \pm SD)	norm. $Z_{\text{átl}}$ (% \pm SD)	norm. $t\Delta Z_{1/2}$ (% \pm SD)
Diklofenák	118,5 \pm 26,9	242,8 \pm 58,7 ^y	93,4 \pm 6,1	78,7 \pm 0,7 ^y
Ibuprofén	105,1 \pm 28,1	73,4 \pm 28,4	98,4 \pm 3,4	111,1 \pm 0,7
Metoprolol	129,8 \pm 20,7	71,2 \pm 27,0	99,3 \pm 0,1	109,1 \pm 0,1
Propranolol	102,0 \pm 5,0	137,1 \pm 34,0	99,4 \pm 3,47	109,8 \pm 26,3

Összegezve azt tapasztaltuk, hogy a citoszkeleton inhibitorok túlnyomó többsége a durotaxis gátlására képes koncentrációban a sejtek adhézióját és/vagy migrációját is szignifikánsan csökkentette. Ezen hatásaikra a 3T3 fibroblasztok a HaCaT keratinocitáknál érzékenyebben reagáltak. A gyakori vízi szennyező gyógyszerhatóanyagok a 2 sejtvonal adhézióját nem befolyásolták jelentősen, azonban a migráció tekintetében a diklofenák mindkét sejtvonalon szignifikáns hatást mutatott.

5. Megbeszélés

Az előző fejezetekben ismertetett eredmények azon kísérleti munkáink összegzését adják, amelyek a vízi környezetben megtalálható antropogén szerves szennyezőanyagok egy viszonylag új, ám jelentős csoportjának a gyógyszer hatóanyagoknak, ill. a kozmetikai termékekben megtalálható illatanyagoknak a sejtszintű hatásait vizsgálták.

Kísérleteink elsődleges célja, a fent említett anyagok sejtproliferációra, viabilitásra, migrációra, valamint az utóbbival szorosan összefüggő sejtadhézióra és szignalizációs utakra kifejtett hatásainak új, korábban nem vagy kevéssé vizsgált aspektusokból történő felderítése volt. E terület jelentősége abból fakad, hogy bár az irodalom számtalan biokémiai, sejtbiológia, vagy akár molekuláris biológia ökotoxicitási tesztről tesz említést, továbbra is limitált azon assay-k köre, amelyek a fenti szennyezőanyagok rendkívül alacsony (pl. ng/l- μ g/l) környezeti koncentrációinak érzékelésére képesek. Mivel a sejt migráció, ill. kemotaxis alapú assay-k érzékenységet az irodalom a viabilitási és proliferációs tesztekénél sok esetben lényegesen magasabbnak írja le (99; 100), munkánk hosszabb távú célja e paraméterek ökotoxikológiai végpontként való alkalmazhatóságának feltárása volt, a vízi környezeti szennyezőanyagok e speciális csoportjára fókuszálva. A migrációban és az annak bevezetőlépéseként létrejövő sejtadhézióban rejlő lehetőség kiaknázására a letapadó sejtek esetében ígéretes megoldást jelentenek az impedancia alapú technikák (93; 95; 140; 176), amelyeket tehát ilyen szempontból igyekeztünk karakterizálni. Továbbá a sejtek mozgásjelenségeinek nemrégiben a figyelem középpontjába került formáját, a durotaxist is megkíséreltük a toxikológia új, innovatív eszközeként vizsgálni.

Emellett figyelembe véve az ökoszisztémák komplex, számtalan fajból és trófikus szintből felépülő rendszerét, valamint a gyógyszerhatóanyagok potenciális ökotoxikológiai kockázatának humán vonatkozásait, kísérleteinkbe a filogenezis különböző, egymástól távoli szintjein álló modelleket vontunk be. Az eukarióta csillós egysejtű *Tetrahymena pyriformis*-t, mint a protozoon trófikus szint reprezentatív képviselőjét, a 3 eltérő szöveti eredetű humán sejtvonalat, pedig a magasabb rendű, elsősorban humán modellként vizsgáltuk.

Az alábbiakban az eddig bemutatott eredményeink átfogó, az irodalmi háttér tükrében értelmezett összefüggései kerülnek bemutatásra a Célkitűzések fejezetben feltett kérdésekre reflektálva.

1. Az illatanyagok kemotaktikus profilja a molekulaszervezeti különbségek fényében

Az illatanyagok által kiváltott migrációs válaszok összehasonlító vizsgálata alátámasztotta a csillós modell kemotaxisának érzékenységét az igen csekély molekulaszervezetbeli eltérések irányában. 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 az izobutil-propionát attraktáns jellege 10^{-9} és 10^{-6} M koncentrációban, vagy a metil-butirát és a metil-izobutirát attraktáns karaktere 10^{-9} M koncentrációban), azért az izomerek kemotaktikus profiljai között számottevő különbségek is előfordultak. Például ilyen különbség volt az izobutil-propionát repellens hatása szemben az izoamil-acetát és a propil-izobutirát kizárólag attraktáns természetével. Hasonló, a kismértékű szerkezetbeli eltérések által okozott molekula-specifikus kemotaktikus válaszokat Munkacsoportunk a *T. pyriformis* modellen korábban is leírt, pl. a 20 fehérje alkotó aminosav esetében, ahol a kiváltott kemotaktikus válasz az aminosavak egyik fizikai-kémiai jellemzőjével, az oldószernek kitett felülettel (solvent exposed area, SEA) is összefüggésbe hozható volt (177). Bár a kemotaxis vizsgálatok kapcsán a citotoxicitási mérésekhez viszonyítva jóval kevesebb kvantatív szerkezet-hatás összefüggés felállításáról számol be az irodalom, úgy tűnik a kemotaxis szempontjából is meghatározó a molekulák szerves/vizes fázis közötti megoszlási hányadosa ($\log K_{o/w}$). Több tanulmány is azt találta, hogy egy adott molekulacsaládon belül, a magasabb megoszlási hányadosú komponensek a jobb membránoldhatóságuk révén, avval kölcsönhatva, hatékonyabban gátolják akár a *Tetrahymena*, akár az emlős spermiumok mozgékonyosságát (178; 179). Az itt bemutatott eredmények esetében nem állítható fel ilyen egyértelmű összefüggés, pl. a $\log P_3 = 2$ megoszlási hányadosú izoamil-acetát a legmagasabb $\log P_3 = 2,7$ pentil-butirátnál erősebb attraktáns választ váltott ki. Ugyanakkor az ellentmondás feloldható lehet, ha figyelembe vesszük a pl. Wu és mtsai által alkalmazott lényegesen magasabb koncentrációkat (10^{-6} - 10^{-3} M) és tágabb $\log P$ tartományokat (1,3-57) (179). A kemotaxis-szerkezet hatás összefüggés felállítása egyébként a kemotaktikus válasz kettős természete (attraktáns vagy repellens) és a koncentrációval nem monoton összefüggést mutató jellege miatt igen nehéz.

A kísérleteinkben legerőteljesebb pozitív kemotaktikus választ kiváltó izoamil-acetát és izobutil-propionát attraktáns karakterét más tanulmányok is megerősítik (pl. izoamil-acetát: *D. melanogaster* (147), *P. marginata* (180), *C. elegans* (148), *G. gallus*

domesticus (181)) azonban a fajok érzékenységének összevetését és a pozitív migrációs válasz koncentrációfüggésének vizsgálatát lehetetlenné teszi, hogy e munkákban az anyagokat gázfázisban alkalmazták. Az említett két észter estében további feromonszerű hatásokról (pl. táplálkozási és párzási szokások befolyásolásáról) is beszámol az irodalom, ezért, mint a rovarcsapdák új lehetséges anyagait tartja őket számon (180; 182). Az aromás aldehidek kemotaktikus hatásáról az észterekével ellentétben nem áll rendelkezésre irodalmi adat.

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 ilyen típusú szennyeződések az előbbieket kemotaktikus hatását nem befolyásolják számottevően.

2. A foszfolipáz-C (PLC) és foszfatidil-inozitol-3-kináz (PI3K) aktivációja a kemoattraktáns észterek szignalizációjában

A kemoattraktáns észterek általi stimuláció eredményeink szerint nem eredményezte a PLC jelentős aktivációját, illetve a kiváltott kemoattraktáns válaszban nem függött a PI3K enzim aktivitásától. Ez összhangban van azon irodalmi eredményekkel, amelyek szerint a 10^{-6} – 10^{-3} M koncentrációban alkalmazott rövid szénláncú alifás észterek (pl. az izoamil-acetát), vagy az aromás aldehidek (pl. furfuril-merkaptán) az adenilát-cikláz közreműködésével c-AMP másodlagos hírvivőn keresztül váltottak ki intracelluláris Ca^{2+} szignált számos gerinces modell szagloneuronjaiban (183-186). Ugyanakkor az emlős szagloneuronokon végzett legújabb kísérletek mégis alátámasztották a foszfoinozitol másodlagos hírvivők illatanyagok szignalizációjában betöltött szerepét. Emellett a keletkezésükben szerepet játszó PLC és PI3K enzimek aktivációját is igazolták (187). Az irodalom jelenleg két hipotézist ismer a foszfoinozitol másodlagos hírvivők szerepét övező ellentmondás feloldására. Az egyik hipotézis szerint a szaganyagok eltérő receptorokon hatva és különböző affinitással képesek a c-AMP, vagy az IP_3 szignalizációs útvonal bekapcsolására, ami a szagészlelés specifitását növelheti. A másik hipotézis szerint viszont, a szagingerre adott azonnali válasz

kialakításáért a c-AMP felelős, míg a későbbi, másodlagos reakciókban (pl. adaptáció) az IP₃-é a főszerep (188). Eredményeink az első hipotézist látszanak igazolni, aminek értelmében az általunk vizsgált illatanyagok kemotaktikus szignalizációja is a c-AMP révén valósulhat meg.

3. A gyakori vízi szennyező gyógyszerek kockázatelemzése az egysejtű modell proliferációja alapján

A 14 gyakori vízi szennyező hatóanyag proliferáció gátló hatásának koncentráció függését figyelembe véve, a molekulák akut toxikus hatása a Tetrahymenára a vízi környezetben nem valószínű, hiszen az acetyl-szalicilsav kivételével egyik sem mutatott szignifikáns proliferáció csökkentő képességet a környezeti szempontból releváns koncentráció tartományban. A két legtoxikusabb csoporton az NSAID és a β -adrenerg molekulacsaládon belül a molekulák relatív toxicitási sorrendje, ill. a meghatározott EC₅₀ értékek nagyságrendje (4,8-181,0 mg/l) az irodalomban megtalálható gyakori, standardizált módszerek (pl. *V. fischeri* lumineszcencia gátlás, *Daphnia* immobilizáció, *Pseudokirichenella*, *Scenedesmus* és *Lemna* alga növekedés gátlási teszt) eredményeivel jó egyezést mutatott (103; 107; 157; 158; 189). Az említett tanulmányok a gyógyszermolekulák hatásmódját e tesztekben általában nonspecifikus mechanizmusként, ú.n. „narkózis”-ként írják le, amelynek erőssége az anyag lipidoldékonyságától függ, azaz a megoszlási hányadossal párhuzamosan nő (103; 189). Az általunk kapott eredményeket az anyagok megoszlási hányadosával összevetve (29. táblázat) kitűnik, hogy e szabály esetünkben nem mindig érvényesül (pl. fenoprofén vs. ibuprofén; eritromicin vs. trimetoprim). Ez felveti annak lehetőségét, hogy a vizsgált molekulák specifikus molekuláris célpontokra is képesek lehetnek hatni a csillós modellben. Emellett a Zhang és munkatársai által hidrofób molekulákkal folytatott fajok közötti összehasonlító tanulmányban a *T. pyriformis*-szal szembeni toxicitás a *Daphnia* és alga alapú tesztek eredményeivel gyenge korrelációt mutatott, jelezve, hogy az anyagok felvétele és hatásmódja az egyes fajok között molekulafüggő módon változhat (57). A gyógyszerhatóanyagok feltételezett specifikus hatásmódját támasztja alá például az antibiotikumok viselkedése. A specifikusan a prokarióta 50S RNS-re ható linkomicin és eritromicin a vizsgált koncentráció tartományban semmilyen hatással nem volt a csillós egysejtű proliferációjára, jóllehet az eritromicin megoszlási hányadosa

viszonylag magas, 3-hoz közeli érték. Ugyanakkor a jóval alacsonyabb ($\log P_3 = 0,9$) megoszlási hányadosú, a bakteriális folsavszintézishez szükséges két eltérő enzimet (dihidropteroát-szintáz és dihidrofolát-reduktáz) gátló szulfametoxazol és trimetoprim magasabb koncentrációkban szignifikánsan csökkentette a *T. pyriformis* proliferációját. Mindkét antibiotikum esetében ismeretes, hogy a prokarióta enzimformához képest ugyan lényegesen kisebb (kb. 0,0001-szeres) affinitással, de az eukarióta homológ enzimeket is képesek gátolni (70). Ugyanakkor a Tetrahymenában mind funkcionálisan (190), mind gén szinten (Tetrahymena Genome Database, génazonosító: TTHERM_00312120) sikerült azonosítani a fenti enzimekkel megegyező feladatot ellátó bifunkciós dihidrofolát- reduktáz-timidilát-szintáz enzimet. Emellett az NSAID-k molekuláris célpontját jelentő ciklooxygenáz (COX) enzimet (191), valamint a β -blokkolók támadáspontját képező β -adrenerg receptorok jelenlétét (192) szintén leírták, bár ezeket gén szinten egyelőre nem sikerült azonosítani.

29. táblázat: A vizsgált hatóanyag megoszlási hányadosának, valamint toxikus és kemotaktikus hatásának összehasonlítása

	logP ₃	Proliferáció		Kemotaxis	
		Hatás	C (M)	Hatás	C (M)
acetyl-szalicilsav	1,2	-	10^{-11} - 10^{-8}	-	10^{-15} , 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-6}
diklofenák	4,4	-	$\geq 10^{-4}$	-	10^{-15} , 10^{-14} , 10^{-12} - 10^{-9}
fenopropfen	3,3	-	$\geq 10^{-4}$	-	10^{-14}
ibuprofen	3,5	-	$\geq 10^{-3}$	-	10^{-7}
naproxén	3,3	-	10^{-3}	+	10^{-13} , 10^{-12}
paracetamol	0,5	+	10^{-3}	-	10^{-14} , 10^{-12} , 10^{-11}
eritromicin	2,7	+	10^{-10} - 10^{-8}	+	10^{-9}
				-	10^{-15}
linkomicin	0,2	0		+	10^{-15} , 10^{-9} , 10^{-7}
				-	10^{-12} , 10^{-6}
szulfametoxazol	0,9	-	$\geq 10^{-3}$	+	10^{-12} , 10^{-11} , 10^{-9} , 10^{-6}
trimetoprim	0,9	-	$\geq 10^{-7}$	-	10^{-14} , 10^{-7}
metoprolol	1,9	-	$\geq 10^{-5}$	-	10^{-15} , 10^{-14} , 10^{-7} - 10^{-6}
propranolol	3,0	-	$\geq 10^{-6}$	-	10^{-15} , 10^{-11} - 10^{-10}
timolol	1,8	-	$\geq 10^{-5}$	+	10^{-6}
				-	10^{-15} , 10^{-14}
Na-diatrizoát	1,8	0		+	10^{-14} , 10^{-7} , 10^{-6}
				-	10^{-8}

Összegezve elmondhatjuk, a *T. pyriformis* mint protozoon modell organizmus figyelembevétel a gyógyszerek ökotoxikus hatásának megítélése során lényeges, mivel az e sejten tapasztalt hatásmódok és hatásos koncentrációk nem extrapolálhatóak egyszerűen a többi organizmuson megfigyelt eredmények alapján.

4. A csillós modell környezeti szempontból releváns koncentrációjú vízi szennyező gyógyszerekre adott migrációs válaszai

A 14 hatóanyagból 13 által - a környezeti szempontból releváns koncentráció tartományban - kiváltott szignifikáns kemotaktikus válasz alátámasztja a migrációs assay-k kiemelkedő érzékenységéről korábban elmondottakat. Az általunk megfigyelt kemorepellens hatások azonos irányba mutatnak azon irodalmi eredményekkel, amelyek arról számolnak be, hogy az NSAID-k (pl. acetilszalicilsav, diklofenák, ibuprofén (193)), a β -blokkolók (pl. metoprolol (194)), egyes antibiotikumok (pl. eritromicin (195)), de még a kontrasztanyag Na-diatrizoát (196) is csökkentette a humán leukociták valamilyen referencia kemoattraktáns szer (általában fMLF baktriális tripeptid) által indukált migrációját. Ugyanakkor a néhány hatóanyag (pl. eritromicin, linkomicin) esetében általunk tapasztalt kettős repellens/attraktáns hatásra az irodalomban szintén találunk utalást, bár kevesebbet. Ez valószínűleg avval is összefügg, hogy a legtöbb tanulmányban az itt bemutatottnál szűkebb koncentráció tartományt vizsgálnak (ld. eritromicin és timolol, ahol az ellentétes hatások optimális koncentrációi között 6 nagyságrend az eltérés). Mindenesetre az itt említett kettős viselkedéshez hasonló leírtak mind gyógyszerhatóanyagok (pl. propranolol), mind egyéb környezeti szennyezőanyagok (pl. peszticid keverék) esetében is (197). A koncentrációfüggő egymással ellentétes hatásokat, valamint a nem monoton, tehát több csúcsot tartalmazó koncentráció-válasz összefüggéseket a szakirodalom a „hormézissel” magyarázza. Ez utóbbi általános jelenség a toxikológia és az ökotoxikológia területén: a filogenezis különböző szintjein álló számtalan modell és assay végpont esetében leírták (198). 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. Ennek szép példája a vazokonstriktor endothelin-1 molekula, amelynek két eltérő optimális kemoattraktáns koncentrációját két különböző receptor típusnak (endothelin-1 és 2 receptornak) sikerült

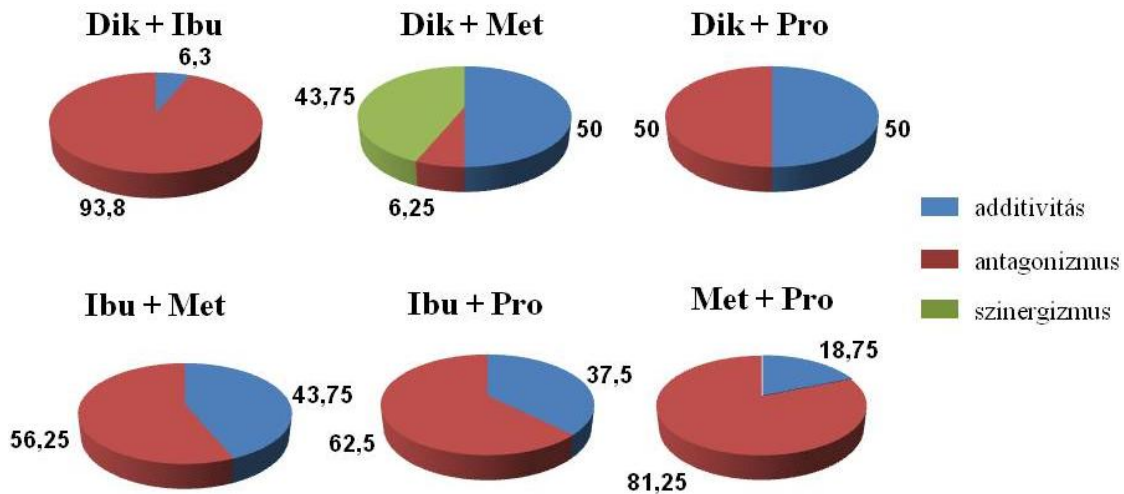
megfeleltetni (199; 200). Ugyanakkor a kemotaxis kialakításában résztvevő receptorok telítettségének szintén szerepe lehet a nem monoton koncentráció-válasz görbék létrejöttében, mivel a kevésbé vagy túltelített receptorok csökkent kemotaktikus választ eredményezhetnek (201). Mindent egybe vetve, az általunk ismertett *T. pyriformis* kemtoaxis assay a gyógyszerhatóanyagok kockázat elemzésekor hasznos és érzékeny *kvalitatív* eszköz lehet a szubletális, viselkedés módosító hatások megítélésére.

5. Hatóanyagpárok keverékhatásai

A kétkomponensű hatóanyag keverékekben jelentkező együttes hatások valamivel több, mint fele (58,3 %-a) antagonista kölcsönhatás volt. Az antagonizmus megjelenési gyakorisága a keverékek összkoncentrációjának növekedésével egyértelműen fokozódott. Ezt jelzi az is, hogy a diklofenák+metoprolol molekulapár kivételével a $\geq 1,5$ Toxikus Egység (TE) összkoncentrációjú elegyekben mindenhol antagonizmust tapasztaltunk egy keveréket (1 TE Dik + 0,5 Pro) leszámítva. Továbbá az is jól látható tendencia, hogy az azonos molekulacsaládból kialakított párokban az antagonizmus gyakoribb volt, mint az eltérő hatásmechanizmusú szerekből létrehozott párokban (29. ábra). E két tény felveti a kompetitív inhibíció lehetőségét, mint az antagonizmus lehetséges magyarázatát, azonban ez az eltérő hatásmechanizmusú párokban nehezebben értelmezhető. A koncentráció additivitás teljesülését az összes keverék 34,4% -ban tapasztaltuk, míg szinergizmust egyedül az eltérő hatásmechanizmusú diklofenák + metoprolol párban figyeltünk meg. Hasonló szinergizmust az eltérő hatásmechanizmusú szerek között Schnell és mtsai. is leírtak hal sejtvonal alapú citotoxicitási assay-kben (168).

A gyógyszerek egyedi toxikus hatásánál korábban elmondottakhoz hasonlóan a keverékek vizsgálata is bizonyította, hogy az ugyanezen szerekkel más gyakori modelleken (*Daphnia*, algák) tapasztalt additivitás (103; 157; 189) nem ültethető át teljes egészében a *T. pyriformis*-ra. Az azonos keverékek különböző modell-organizmusokon megfigyelhető, eltérő együttes hatás típusát az irodalomban más tanulmányok is leírták (103; 202). Az általunk kapott együttes hatás típusok koncentráció szerinti eloszlását elemezve, a nehézfémek esetében a Tetrahymenánál leírt (113), az egyedi komponensek arányával korreláló mintázat nem volt

megfigyelhető; inkább a Pomati és mtsai. által is tapasztalt (203; 204) komplex együttes hatás típus profilt kaptunk.



29. ábra: Az együttes hatás 3 típusának százalékos gyakorisága a 6 vizsgált hatóanyagpár keverékeiben

Eredményeinket összegezve elmondhatjuk, hogy a vizsgált hatóanyagpárok esetében additív, sőt szinergista együttes hatást is tapasztaltunk. Ez jelzi, hogy e hatóanyagok keverékeiben az önmagukban nem vagy gyenge hatást kiváltó koncentrációban jelenlevő molekulák egymás hatását potencírozva szignifikáns toxikus hatást eredményezhetnek. Ugyanakkor a megfigyelt antagonista és szinergista kölcsönhatások azt is jelezték, hogy a *T. pyriformis*-on a vizsgált 4 hatóanyag keverékeiben a koncentráció additív modell nem prediktálta kielégítően a várható globális toxikus hatást.

6. A *T. pyriformis* assay kombináció gyakorlati alkalmazása

A fent említett profileráció gátlás és kemotaxis assay kombinációt a csillós modellel folytatott kísérleteink lezárásaként egy lehetséges gyakorlati alkalmazási területen, a szennyező gyógyszerhatóanyagok lebontásának nyomonkövetésére használtuk. Jóllehet e területen jelenleg a standardizált *V. fisheri* limuneszcencia gátlási teszt a domináns módszer, a *Tetrahymena* protozoon mint új modell egyidejű alkalmazásának hasznosságát alátámasztják a hasonló témában született fajok közötti összehasonlító elemzések. Andreozzi és mtsai. pl. a diklofenák és kinolon antibiotikumok keverékeinek nagyhatékonyságú oxidációs bontása során azt tapasztalták, hogy a minták toxicitása a kezelési idő függvényében az algáknál és a kerekeshéjűeknél eltérően alakult (205).

Eredményeink alapján az említett két módszer kombinált alkalmazásának létjogosultsága megerősítést nyert, hiszen mindkét módszerrel különbséget tapasztaltunk mind az eltérő kezelési idő után vett, mind az eltérő bontási körülményekből származó minták biológiai aktivitása között. A proliferáció gátlás során tapasztalt eltérő lefutású kezelési idő – proliferáció inhibíció görbék a kémiai analízis eredményeivel is összefüggésbe hozhatónak bizonyultak. Ilyen módon a 10 s - 900 s kezelést követően vett mintáknál az O₂-telített környezetből származó minták fokozott toxikus hatását az O₂-mentes mintákhoz képest a nagyobb mennyiségben képződött 5-hidroxi-diklofenák jelenlétével magyarázhatjuk. Hasonló eredményekről számoltak be a diklofenák γ -radiolízise kapcsán is, amelyben az oxidatív körülmények között keletkező bomlástermékek toxicitása a *V. fischeri*n erősebb volt, mint a redukív körülmények mellett keletkezők termékeké (206). 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 szerves vegyületekké alakulása) állhat. Az O₂-telített mintáknál a mineralizáció > 70%, míg az O₂-menteseknél 20-25 %. Ez okozhatja, hogy míg az előbbieknél toxikus hatása a kezelési idő növelésével gyakorlatilag 0 %-ra csökken a 3600 s-os mintáknál, addig az utóbbiak toxicitása az idő előrehaladtával nem változik. Emellett egyes irodalmi adatok szerint a fotolízis ezen szakaszában az alkalmazott analitikai módszerekkel nem detektálható di- és polimer bomlástermékek is keletkezhetnek, amelyek hozzájárulhatnak a tapasztalt toxikus hatáshoz (207).

A kemotaxis vizsgálatok eredményei a fentieket kiegészítve arra utalnak, hogy a toxikus hatást már nem mutató 3600 s-os bontási idő után vett O₂-telített minták is rendelkeznek szubletális, migrációt befolyásoló hatással. Emellett az is kiderült, hogy a fotolízis során keletkező bomlástermékek a kiindulási vegyület kemorepellens jellegét megőrzik, bár a kapott kemotaktikus válaszok pontosabb értelmezéséhez a keletkező bomlástermékek egyéni vizsgálata mindenképpen szükséges. Ugyanakkor figyelembe véve az elérhető hasonló témájú tanulmányokat elmondható, hogy elsőként vizsgáltuk a környezeti szennyező gyógyszerhatóanyagok fotodegradációs termékeinek szubletális, sejtmigrációra kifejtett hatását.

7. A gyógyszerhatóanyagok citotoxicitása a humán sejtvonalakon

A 3 sejtvonalon a klasszikus, mitokondriális dehidrogenáz alapú (MTT) citotoxicitás mérési módszert alkalmazva azt tapasztaltuk, hogy a 14 környezeti szennyező gyógyszerhatóanyaggal szemben a humán sejtvonalak a *T. pyriformis*-nál általában kevésbé érzékenyek voltak. Kivételt jelentett ez alól az eritromicin és a paracetamol, aminél a HaCaT, ill. az MCF7 sejtek mutatták a legnagyobb érzékenységet. Emellett a diklofenák esetében a csillós modellen mért EC_{50} érték gyakorlatilag megegyezett a 3 sejtvonalon kapott eredményekkel. Továbbá a fenoprofén esetében a HepG2 sejtvonala az egysejtű modellel közel azonos viselkedést mutatott. A legnagyobb eltérést a két modell rendszer érzékenysége között a propranolol esetében tapasztaltuk, ahol a csillós modell érzékenysége 10-szer nagyobb volt, bár valamennyi modellen a komponens bizonyult a legtoxikusabbnak. A propranololnak a többi β -blokkolóhoz, sőt a hatóanyagok szélesebb köréhez viszonyított kiemelkedő toxicitását az irodalom az erős membránstabilizáló hatásának tulajdonítja (56). A humán HepG2 sejtvonala Tetrahymenához képest alacsonyabb érzékenységet írták le Rudzok és mtsai. is, akik nem csak a peszticidekkel, de a diklofenákkal szemben is kb. 10-szer érzékenyebbnak találták ez utóbbit (106). A megfigyelést a letapadó, egymással szorosan illeszkedő, sőt adott esetben egymásra is növekvő humán sejtek, a szabadon mozgó Tetrahymenához képest jelentősen kisebb fajlagos expozíciós felületével magyarázták (106). A sejtvonalakon mért EC_{50} értékek legtöbbször expozíciós időtől független volta arra utal, hogy az anyagok gyorsan metabolizálódtak a sejtekben, ahol inaktív termékek keletkeztek belőlük (170). Az EC_{50} két alkalommal csökkent jelentősen (kb. a felére) az expozíciós idő 24 h-ról 72 h-ra való növelésével, a diklofenák (HaCaT) és a fenoprofén (MCF7) esetében. Ez utalhat arra, hogy ezen anyagokból a sejtekben a metabolizáció során hatásosabb termék jött létre. Ugyanakkor az irodalomban egymásnak ellentmondó adatok találhatóak arra nézve, hogy az általunk vizsgált hatóanyagok (pl. naproxén, ibuprofén, diklofenák) a transzformációjukért elsősorban felelős CYP1A enzim (170) aktivitását indukálják (170; 208), vagy gátolják-e (209). A sejtvonalak tekintetében az irodalmi adatok alapján a HaCaT sejtvonala igen kismértékű citokróm-P450 aktivitással rendelkezik (210), míg a HepG2 és az MCF7 sejtekben ezen enzim alap aktivitása jelentősebb (211). Mivel azonban az MTT módszerrel kísérleteink elsődleges célja

referencia effektív koncentráció értékek meghatározása volt, így a fenti kérdés mélyebb elemzésétől a továbbiakban eltekintünk.

8. *A sejt adhézió és migráció impedancia alapú detektálásának alkalmazhatósága a hatóanyagok ökotoxikus hatásának detektálására*

Az impedancia alapú valós idejű viabilitás méréssel megállapított EC₅₀ értékek alátámasztották az irodalomban a módszer érzékenységére és a hagyományos végpont assay-kkel (pl. neutrál vörös felvétel) való összevethetőségére vonatkozó megállapításokat (212), amelyeket pl. az ibuprofén és a propranolol esetében írtak le. Ugyanakkor akár az adhézió, akár a migráció impedimetriás követésével sem lehetett a környezeti szempontból releváns koncentrációban alkalmazott, kiválasztott hatóanyagok számottevő sejtbiológiai hatását kimutatni. Ez alól a propranolol HaCaT keratinocitákon megfigyelt igen enyhe migrációt lassító hatása volt kivétel, amiben valószínűleg a propranolol korábban említett membránstabilizáló képességének lehet szerepe. Eredményeinket a korábbi, ECIS rendszerben megvalósított ökotoxikológiai mérések pozitív eredményeivel összevetve, a különbség valószínűleg avval magyarázható (94; 95), hogy e korábbi munkákban szennyezőanyagként peszticideket és olyan oldószereket alkalmaztak, amelyeknek citotoxikus hatása az általunk vizsgált gyógyszerekénél eleve jelentősebb. Hiszen az itt bemutatott gyógyszerek az emberi szervezet szempontjából hatásos, terápiás koncentrációi is nagyságrendekkel (legalább 2-3) meghaladják a környezeti koncentrációkat, ahogyan ezt a korábbi migrációval kapcsolatos irodalmi eredmények (193; 194) is alátámasztják.

9. *A HaCaT keratinocita és az MCF7 emlő karcinóma sejtvonal eltérő mechanoszenzitivitásának karakterizálása*

Durotaxis vizsgálataink bevezető szakaszában azt tapasztaltuk, hogy a HaCaT keratinociták a vékonyabb ($H < 15 \mu\text{m}$) vastagságú géleken preferáltan a magasabb látszólagos rigiditású területeken helyezkedtek el, az MCF7 emlő karcinóma eredetű sejtek lokalizációja viszont független volt a látszólagos rigiditástól mindkét gélvastagság esetében. E megfigyeléseinket az alkalmazott felszíni kezelés (poli-D-lizin, vagy fibronectin) nem befolyásolta. A keratinociták preferenciáját a rigidebb szubsztrátokkal szemben több irodalmi adat is megerősíti, amelyek a keratinociták

(lágyabb szubsztrátokhoz viszonyított) fokozott kiterültségéről, proliferációjáról (213) és migrációjáról (141) számolnak be. Ugyanakkor az irodalmi adatokban 1 nagyságrend eltérés mutatkozik avval kapcsolatban, hogy mi az a rétegvastagság, amelyen keresztül a sejtek a rigiditást érzékelnéi képesek (1-2 μm (214; 215) vs. 10 - 20 μm (37)). Eredményeink inkább az utóbbi nagyságrend irányába mutatnak, ugyanakkor irodalmi adatok alapján az érzékelhető mélység függ a sejt által a gél felszínre kifejtett erő nagyságától, így sejtípusonként is változhat (214).

Az MCF7 sejtek „stiffness” iránti érzéketlenségének legvalószínűbb magyarázata a sejtek tumoros eredete lehet. Irodalmi adatok alapján ugyanis az onkogénekkal transzformált (216), vagy metasztatikus (217) sejteknél eltűnik az fiziológias folyamatok (pl. proliferáció, migráció) „stiffness”-függő jellege. Ez érthető is, annak tükrében, hogy a szervezetben a metasztázist képző malignus sejteknek számtalan különböző, ezáltal eltérő mechanikai tulajdonságú szöveten kell átjutnia. Továbbá az irodalom arról is beszámolt, hogy az alacsony metasztatikus potenciálú egér emlő tumor sejtek fibronectin függő folyamat révén képesek voltak a szubsztrát rigiditását érzékelnéi, viszont a nagy metasztatikus potenciálú sejtek nem (218). Eredményeinkkel tehát egy új, korábban nem vizsgált humán emlő karcinóma sejtvonalon is megerősítenünk, hogy a tumoros sejtek elveszítik a környezet rigiditása iránti érzéketlenségüket, amely a metasztatikus potenciál és metasztázis képzés igen fontos összetevője. Természetesen a folyamat pontos molekuláris háttere még tisztázására szorul, e megfigyelés azonban nagyban hozzájárulhat mind a tumorok patomechanizmusának megértéséhez, mind a jelenlegieknél hatékonyabb tumorterápiák kifejlesztéséhez. A legjelentősebb nyitott kérdések többek között a különböző citoskeletális durotaxisban betöltött szerepét, ill. a durotaxis gyógyszeres befolyásolásának lehetőségét is érintik. Emellett érdekes tény, hogy az MCF7 sejtekkel metasztatikus potenciáljával kapcsolatban az irodalom nem egységes, bár inkább az alacsony metasztatikus képesség felé hajlik (219; 220), jól lehet e sejt immunhiányos egerekben képes *in vivo* metasztázisok kialakítására (221). Ez felveti annak a hosszú távú lehetőségét, hogy a mechanoszenzitivitást a metasztatikus potenciál egy új markereként alkalmazzák, akár a klinikai kutatások, vagy a diagnosztika területén.

10. A citoskeletális elemek szerepe a durotaxisban; a durotaxis, a sejtadhézió és a migráció kapcsolata

A citoskeletális inhibitorok durotaxisra kifejtett hatásának vizsgálata során bebizonyosodott, hogy valamennyi szer képes a durotaxis gátlására az akut citotoxikus hatás okozó koncentrációnál valamivel alacsonyabb koncentrációban. Ugyanakkor nem kizárható, hogy e komponensek a sejt alapvető migrációs képességére, motilitására kifejtett hatásuk révén befolyásolják a durotaxisát. A környezet mechanikai tulajdonságainak érzékelésében az integrinek (β 1-integrinek) játszanak döntő szerepet (30), a citoskeleton (azon belül is elsődlegesen az aktin mikrofilamentum rendszer) a sejt mozgását biztosítja. Impedimetriás eredményeink (30. táblázat) alátámasztották, hogy a citoskeletonra ható inhibitorok a durotaxis gátlására képes koncentrációkban a sejtadhézióra és migrációra is kihatással voltak. Ezen megfigyeléseink egybe vágnak Kirmse és mtsainak. eredményeivel, akik szintén leírták a sejt adhéziójának, erő kifejtésének és durotaxisának egymástól való kölcsönös függését (21). Citoklazin-D-t és blebbistatint alkalmazva melanóma sejteken azt találták, hogy míg az előbbi az adhézióra képes sejtek számát, a sejtek kiterültségét és durotaxisát is jelentősen csökkentette, addig a blebbistatin a sejtek morfológiáját nem érintette, de a durotaxisát gátolta. Összességében a citoskeletális elemek szerepével kapcsolatosan az irodalmi adatok az általunk tapasztalt eredményekkel egy irányba mutatnak, nevezetesen, hogy valamennyi komponens részt vesz a durotaxis létrehozásában. Az aktin és a miozin II. motorok inhibitoraival végzett vizsgálatok egyértelműen arra utalnak, hogy e két citoskeletális komponens működésének hiányában a sejt képtelen erőt kifejteni, ami csökkent migrációhoz és durotaxisához vezet (20; 22). A mikrotubulusok nokodazollal vagy kolhicinnel végzett gátlása során a különböző tanulmányok eredményei azonban némileg egymásnak ellentmondóak, nem egyértelmű, hogy a mikrotubulusok által generált erő hozzájárul-e a szubsztrátra gyakorolt erő kifejtéshez (19), vagy sem (22). Az ellentmondás feloldására az a hipotézis született, hogy a mikrotubulusok részvétele az erő kifejtésben sejt típus és assay-függő lehet (222). Az általunk rendkívül drasztikus hatásúnak talált kalikulint az irodalom, mint a miozin II. indirekt aktivátorát tartja számon, de az itt megfigyelt negatív hatásokban közrejátszhat az intermedier filamentumok (pl. vimentin) lokalizációjára kifejtett hatása is (223), mivel ezek szintén

részt vesznek mind a sejtek morfológiájának és migrációjának kialakításában (224; 225), mind a mechanikai jelek transzdukciójában (226).

30. táblázat: A különböző citoskeletális inhibitorok adhézióra és migrációra kifejtett hatásának összegzése

	3T3			HaCaT		
	C (μ M)	Adhézió	Migráció	C (μ M)	Adhézió	Migráció
Citokalazin-B	0,5	↓↓↓	↓↓↓	0,25	0	0
Citokalazin-D	2,5	↓↓↓	↓↓↓	7	↓↓↓	↓↓↓
Falloidin	0,75	↓↓↓	↓↓↓	1	↓↓↓	↓↓↓
Kolhicin	12	↓↓↓	↓↓↓	5	↑	↓↓↓
Nokodazol	0,75	↓↓↓	↓↓↓	10	↑	↓↓↓
Blebbistatin	4	↓	↓	8	↓	0
Kalikulin-A	0,001	↓↓↓	↓↓↓	0,002	↓↓↓	↓↓↓

A két sejtvonal érzékenységében megfigyelt különbségekhez (szinte minden esetben a 3T3 sejtvonal bizonyult érzékenyebbnek) hozzájárulhat a két sejtvonal eltérő eredete (egér vs. humán). Emellett, különbség lehet a két sejtípusra jellemző fajlagos expozíciós területben is, figyelembe véve a HaCaT sejtekre jellemző, rendkívül szorosan rendezett konfluens növekedést, szemben a 3T3 fibroblasztokra jellemző lazább elrendeződéssel.

11. Klinikai és környezeti szempontból jelentős gyógyszerek hatása a durotaxisra

A 4 nagy mennyiségben alkalmazott, ezáltal gyakori vízi szennyező gyógyszermolekula durotaxisra kifejtett hatásának vizsgálata igen érdekes eredményeket hozott, mivel azt tapasztaltuk, hogy a 2 NSAID nem, viszont a 2 β -blokkoló gátolta a sejtek durotaxisát. 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 sejtvonalon lassította a migrációt, a HaCaT keratinocitáknál enyhén fokozta. A diklofenák sejtípus függő, ellentétes irányú hatására találunk egyéb példát is az irodalomban. Míg a leukociták és számos tumor sejtípus attraktáns indukálta kemotaxisát a diklofenák csökkentette, addig a melanóma sejtek migrációját fokozta (227) bár itt az eltérés a különböző módszerek (transwell assay, scratch assay)

alkalmazásából is fakadhat. Mivel egyik molekulacsalád szerepét sem vizsgálták eddig a sejtek rigiditás iránti érzékenységgel, ill. durotaxisával kapcsolatban, az eredmények értelmezése igen nehéz és mindenképpen szükségesek további vizsgálatok. A β -adrenerg agonisták és antagonisták keratinociták migrációjára és a bőr sebgyógyulási folyamataira kifejtett hatásaival kapcsolatban azonban a téma klinikai relevanciájának köszönhetően van hozzáférhető irodalom. Ezek alapján a sebgyógyulásban résztvevő valamennyi sejt típus expresszál β -adrenerg receptorokat (elsősorban a β_2 típust) (228; 229), amelyeknek antagonizálása a sejtek migrációját a MEK-ERK szignalizációs útvonalon keresztül fokozta (229). A metoprolol és a propranolol hatásos koncentrációi mindkét sejten 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. Hiszen a metoprolol szelektív β_1 -adrenerg receptor inhibitor, a propranolol azonban nemszelektíven gátolja mind a β_1 -, mind a β_2 -adrenerg receptorok működését. A 71 különböző humán szövet génextpressziós mintázatát feldolgozó adatbázis (www.biogps.org) alapján a bőr sejtjei mind a két receptor típust expresszálják, bár a β_2 forma egész szervezethez viszonyított relatív expressziója valamivel magasabb (8,55 %), mint a β_1 típusé (6,75 %). Ez szintén magyarázhatja, miért alacsonyabb a propranolol hatásos koncentrációja mind a két sejt vonalon. Csak érdekességképpen jegyezzük meg, hogy mindkét molekula esetében ismertek adrenerg-receptor független hatások (108; 109).

Bár a durotaxis molekuláris hátterének részletei egyelőre tisztázatlanok, a bemutatott eredmények azt mutatják, hogy az alkalmazott durotaxis assay segítségével a klinikumban is gyakran alkalmazott gyógyszerek hatása szempontjából értékes, új információkat nyerhetünk, másrészt a környezeti szennyezőanyagok vizsgálata szempontjából is új aspektust jelenthet a mechanikai és kémiai ingerek sejtbiológiai hatásainak szimultán figyelembevétele.

Összegezve eredményeinket megállapíthatjuk, hogy bár munkánk nyomán sok, a *Céltűzések* fejezetben megfogalmazott kérdésre választ kaptunk, az elért eredmények – különösképpen az irodalmi adatok tükrében - számtalan új kérdést vetnek fel. Az eredményeink alapján levonható legfőbb következtetéseket, ill. munkánk összegzését a következő fejezetekben mutatjuk be.

6. 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 családotk tagjainak egyedi proliferáció gátló hatása a vizekben a *T. pyriformis*-ra nem várható.
- A hatóanyagpárokbán 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 sejt vonalakon 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 sejt vonal 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 sejt vonal a durotaxis szempontjából eltérően viselkedtek.
- A referenciának választott 3T3 fibroblaszt sejt vonalon és a HaCaT sejt vonalon 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 antagonistá képes a gyógyászatban alkalmazott terápiás koncentrációtartományban a 3T3 és a HaCaT sejtek durotaxisát gátolni.

7. 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 modell-sejt 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 kemotaxismérésből álló tesztrendszerünket a diklofenák bontására használt vákuum-UV fotólízis optimális műveleti paramétereink beállításához a gyakorlatban is alkalmaztuk.

Ezek alapján munkánk második fázisában humán sejt vonalakon 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 sejt vonalak migrációját befolyásolni.

Végezetül egy új durotaxis mérésre alkalmas platformon karakterizáltuk a HaCaT humán keratinocita és az MCF7 humán emlő karcinóma sejt vonal 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 durotaxist befolyásolni.

Summary

Cell migration is a crucial physiological process in unicellular as well as in multicellular organisms and also a sensitive behavioral response elicited by external physical and chemical cues. This allows to study the cell biological effects of anthropogenic environmental pollutants in models from different levels of the phylogeny.

Firstly, we compared proliferation and chemotactic responses of the freshwater ciliate *T. pyriformis* using odorants and frequently detected aquatic contaminant pharmaceuticals. For each group of substances chemotaxis proved to be a highly sensitive response in terms of both slight changes in the molecular structure and the low effective concentrations. However, because chemotactic response curve showed hormesis, proliferation inhibiting capacity could better quantify cellular effects of drugs and showed better predictive power. Based on this later we studied combined effect of pharmaceutical mixtures in which we described additive and synergistic interactions underlying the importance of taking into consideration the eventual mixture effects when assessing environmental risk of human pharmaceuticals. Then we applied our methods in practice to find optimal operating parameters of vacuum-UV photolysis used for the degradation of diclofenac.

In the next step we evaluated cytotoxic effect of drugs on human cell lines and compared the sensitivity of the conventional mitochondrial dehydrogenase based MTT assay with the impedimetric viability detection. We concluded that this later allowed for a more sensitive detection and the relative toxicity of the tested drugs showed good correlation between the two methods. We also used a new setup for the impedimetric measurement of migration influencing effect of drugs and concluded that only propranolol could alter cell migration significantly at environmental concentration.

Finally, using an innovative durotaxis measurement platform we characterized the differing mechanosensitivity of the human keratinocyte and the mammary carcinoma cell lines. We also performed quantitative description of the durotaxis inhibiting effect of cytoskeleton inhibitors as well as the screening of clinically and environmentally relevant NSAIDs and β -adrenergic antagonists. In the case of β -blockers we could first demonstrate the durotaxis inhibiting capacity of environmental pollutants.

8. Irodalomjegyzék

1. Dunn GA. (1990) Conceptual problems with kinesis and taxis. In *Biology of chemotactic response*, ed. JP Armitage, JM Lackie. Cambridge University Press Cambridge, UK: 1-13.
2. Benhamou S, Boveé P. (1989) How animals use their environment: a new look at kinesis. *Anim Behav* 38:375-383
3. Taylor BL, Zhulin IB, Johnson MS. (1999) Aerotaxis and other energy-sensing behavior in bacteria. *Ann Rev Microbiol* 53:103-128
4. Kim DH, Casale D, Kóhidai L, Kim MJ. (2009) Galvanotactic and phototactic control of *Tetrahymena pyriformis* as a microfluidic workhorse. *App Phys Lett* 94:163901-163903
5. Li S, Butler P, Wang Y, Hu Y, Han DC, Usami S, Guan JL, Chien S. (2002) The role of the dynamics of focal adhesion kinase in the mechanotaxis of endothelial cells. *PNAS* 99:3546-3551
6. Mycielska ME, Djamgoz MBA. (2004) Cellular mechanisms of direct-current electric field effects: galvanotaxis and metastatic disease. *J Cell Sci* 117:1631-1639
7. Lo C-M, Wang H-B, Dembo M, Wang YL. (2000) Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophys J* 79:144-152
8. Discher DE, Mooney DJ, Zandstra PW. (2009) Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells. *Science* 324:1673-16777
9. Justin RT, Engler AJ. (2011) Stiffness gradients mimicking in vivo tissue variation regulate mesenchymal stem cell fate. *PloS one* 6:e15978
10. Guo WH, Frey MT, Burnham NA, Wang YL. (2006) Substrate rigidity regulates the formation and maintenance of tissues. *Biophys J* 90:2213-2220
11. Kunkel SL, Standiford T, Kasahara K, Strieter RM. (1991) Interleukin-8 (IL-8): The Major Neutrophil Chemotactic Factor in the Lung. *Exp Lung Res* 17:17-23
12. Frankel RB, Bazylinski DA, Johnson MS, Taylor BL. (1997) Magneto-aerotaxis in marine coccoid bacteria. *Biophys J* 73:994-1000

13. Bahat A, Tur-Kaspa I, Gakamsky A, Giojalas LC, Breitbart H, Eisenbach M. (2003) Thermotaxis of mammalian sperm cells: A potential navigation mechanism in the female genital tract. *Nat Med* 9:149-150
14. Litvin FF, Sineshchekov OA, Sineshchekov VA. (1978) Photoreceptor electric potential in the phototaxis of the alga *Haematococcus pluvialis*. *Nature* 271:476-478
15. Friedl P, Alexander S. (2011) Cancer Invasion and the Microenvironment: Plasticity and Reciprocity. *Cell* 147:992-1009
16. Parsons JT, Horwitz AR, Schwartz MA. (2010) Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11:633-643
17. Roussos ET, Condeelis JS, Patsialou A. (2011) Chemotaxis in cancer. *Nat Rev Cancer* 11:573-87
18. Fletcher DA, Mullins RD. (2010) Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature* 463:485-492
19. Stamenović D, Mijailovich SM, Tolić-Nørrelykke IM, Chen J, Wang N. (2002) Cell prestress. II. Contribution of microtubules. *Am J Physiol Cell Physiol* 282:C617-C24
20. Vincent LG, Choi YS, Alonso-Latorre B, del Álamo JC, Engler AJ. (2013) Mesenchymal stem cell durotaxis depends on substrate stiffness gradient strength. *Biotech J* 8:472-484
21. Kirmse R, Otto H, Ludwig T. (2011) Interdependency of cell adhesion, force generation and extracellular proteolysis in matrix remodeling. *J Cell Sci* 124:1857-1866
22. Pelham RJ, Wang YL. (1999) High resolution detection of mechanical forces exerted by locomoting fibroblasts on the substrate. *Mol Biol Cell* 10:935-945
23. Kovács M, Tóth J, Hetényi C, Málnási-Csizmadia A, Sellers JR. (2004) Mechanism of Blebbistatin Inhibition of Myosin II. *J Biol Chem* 279:35557-35563
24. Ishihara H, Martin B, Brautigan D, Karaki H, Ozaki H, Kato Y, Fusetani, N, Watabe S, Hashimoto K, Uemura D. (1989) Calyculin A and okadaic acid: inhibitors of protein phosphatase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 159:871-877

25. Califano JP, Reinhart-King CA. (2013) Matrix Mechanics and Cell Contractility in Angiogenesis. In *Mechanical and Chemical Signaling in Angiogenesis*: Springer: 143-60
26. Carraher CL, Schwarzbauer JE. (2013) Regulation of Matrix Assembly through Rigidity-dependent Fibronectin Conformational Changes. *J Biol Chem* 288:14805-148014
27. Lulevich V, Yang HY, Rivkah Isseroff R, Liu GY. (2010) Single cell mechanics of keratinocyte cells. *Ultramicroscopy* 110:1435-1442
28. Helmke BP, Goldman RD, Davies PF. (2000) Rapid displacement of vimentin intermediate filaments in living endothelial cells exposed to flow. *Circ Res* 86:745-752
29. Berrier AL, Yamada KM. (2007) Cell–matrix adhesion. *J Cell Physiol* 213:565-573
30. Moore SW, Roca-Cusachs P, Sheetz MP. (2010) Stretchy proteins on stretchy substrates: the important elements of integrin-mediated rigidity sensing. *Dev Cell* 19:194-206
31. Luo B-H, Carman CV, Springer TA. (2007) Structural Basis of Integrin Regulation and Signaling. *Annu Rev Immunol* 25:619-647
32. Friedl P, Gilmour D. (2009) Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10:445-457
33. Friedland JC, Lee MH, Boettiger D. (2009) Mechanically activated integrin switch controls $\alpha 5\beta 1$ function. *Science* 323:642-644
34. Janmey PA, Miller RT. (2011) Mechanisms of mechanical signaling in development and disease. *J Cell Sci* 124:9-18
35. Kidoaki S. (2010) Mechanics in Cell Adhesion and Motility on the Elastic Substrates. *J Biomech Sci Eng* 5:218-228
36. Ghibaudo M, Saez A, Trichet L, Xayaphoummine A, Browaeys J, Silberzan P, Buguin A, Ladoux B. (2008) Traction forces and rigidity sensing regulate cell functions. *Soft Matter* 4:1836-1843
37. Buxboim A, Rajagopal K, Andre'EX B, Discher DE. (2010) How deeply cells feel: methods for thin gels. *J Phys: Condens Matter* 22:194116

38. Yeung T, Georges PC, Flanagan LA, Marg B, Ortiz M, Funaki M, Zahir N, Ming W, Waever V, Janmey PA. (2005) Effects of substrate stiffness on cell morphology, cytoskeletal structure, and adhesion. *Cell Motil Cytoskel* 60:24-34
39. Flanagan LA, Ju Y-E, Marg B, Osterfield M, Janmey PA. (2002) Neurite branching on deformable substrates. *Neuroreport* 13:2411
40. Wang N, Tytell JD, Ingber DE. (2009) Mechanotransduction at a distance: mechanically coupling the extracellular matrix with the nucleus. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10:75-82
41. Bershadsky AD, Balaban NQ, Geiger B. (2003) Adhesion-dependent cell mechanosensitivity. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19:677-695
42. Geiger B, Spatz JP, Bershadsky AD. (2009) Environmental sensing through focal adhesions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10:21-33
43. Holle AW, Engler AJ. (2011) More than a feeling: discovering, understanding, and influencing mechanosensing pathways. *Curr Opin Biotechnol* 22:648-654
44. Sukharev S, Anishkin A. (2004) Mechanosensitive channels: what can we learn from 'simple' model systems? *Trend Neurosci* 27:345-351
45. Matthews BD, Overby DR, Mannix R, Ingber DE. (2006) Cellular adaptation to mechanical stress: role of integrins, Rho, cytoskeletal tension and mechanosensitive ion channels. *J Cell Sci* 119:508-518
46. del Rio A, Perez-Jimenez R, Liu R, Roca-Cusachs P, Fernandez JM, Sheetz MP. (2009) Stretching single talin rod molecules activates vinculin binding. *Science* 323:638-641
47. Insall R. 2013. The interaction between pseudopods and extracellular signalling during chemotaxis and directed migration. *Curr Opin Cell Biol*
48. Rappel WJ, Loomis WF. (2009) Eukaryotic chemotaxis. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 1:141-149
49. Devreotes P, Janetopoulos C. (2003) Eukaryotic chemotaxis: distinctions between directional sensing and polarization. *J Biol Chem* 278:20445-20448
50. Xiao Z, Zhang N, Murphy DB, Devreotes PN. (1997) Dynamic distribution of chemoattractant receptors in living cells during chemotaxis and persistent stimulation. *J Cell Biol* 139:365-374

51. Janetopoulos C, Firtel RA. (2008) Directional sensing during chemotaxis. *FEBS Lett* 582:2075-2085
52. Pandey G, Jain RK. (2002) Bacterial chemotaxis toward environmental pollutants: role in bioremediation. *Appl Environ Microbiol* 68:5789-5795
53. Singh R, Olson MS. (2008). Application of bacterial swimming and chemotaxis for enhanced bioremediation. In *Emerg Environ Technol*. Springer: 149-72 pp.
54. Snyder SA, Westerhoff P, Yoon Y, Sedlak DL. (2003) Pharmaceuticals, personal care products, and endocrine disruptors in water: implications for the water industry. *Environ Eng Sci* 20:449-469
55. Verhaar HJM, van Leeuwen CJ, Hermens JLM. (1992) Classifying environmental pollutants. *Chemosphere* 25:471-491
56. Fent K, Weston AA, Caminada D. (2006) Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquat Toxicol* 76:122-159
57. Zhang XJ, Qin HW, Su LM, Qin WC, Zou MY, Sheng LX, Zhao YH, Abraham MH. (2010) Interspecies correlations of toxicity to eight aquatic organisms: Theoretical considerations. *Sci Tot Environ* 408:4549-4555
58. Farré MI, Pérez S, Kantiani L, Barceló D. (2008) Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment. *Trends Anal Chem* 27:991-1007
59. Santos LHMLM, Araújo AN, Fachini A, Pena A, Delerue-Matos C, Montenegro MCBSM. (2010) Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *J Hazard Mater* 175:45-95
60. Winker M, Faika D, Gulyas H, Otterpohl R. (2008) A comparison of human pharmaceutical concentrations in raw municipal wastewater and yellowwater. *Sci Tot Environ* 399:96-104
61. Heberer T. (2002). Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicol Lett* 131:5-17
62. Paxéus N. (2004). Removal of selected non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), gemfibrozil, carbamazepine, beta-blockers, trimethoprim and triclosan in conventional wastewater treatment plants in five EU countries and their discharge to the aquatic environment. *Water Sci Technol* 50:253-260

63. Castiglioni S, Bagnati R, Fanelli R, Pomati F, Calamari D, Zuccato E. (2005). Removal of Pharmaceuticals in Sewage Treatment Plants in Italy. *Environ Sci Technol* 40:357-363
64. Roberts PH, Thomas KV. (2006). The occurrence of selected pharmaceuticals in wastewater effluent and surface waters of the lower Tyne catchment. *Sci Tot Environ* 356:143-153
65. Nikolaou A, Meric S, Fatta D. (2007) Occurrence patterns of pharmaceuticals in water and wastewater environments. *Anal Bioanal Chem* 387:1225-1234
66. Ikehata K, Jodeiri Naghashkar N, Gamal El-Din M. (2006) Degradation of Aqueous Pharmaceuticals by Ozonation and Advanced Oxidation Processes: A Review. *Ozone: Sci Eng* 28:353-414
67. Ziylan A, Ince NH. (2011) The occurrence and fate of anti-inflammatory and analgesic pharmaceuticals in sewage and fresh water: Treatability by conventional and non-conventional processes. *J Hazard Mater* 187:24-36
68. Klavarioti M, Mantzavinos D, Kassinos D. (2009). Removal of residual pharmaceuticals from aqueous systems by advanced oxidation processes. *Environ Int* 35:402-417
69. Kümmerer K. (2009) Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I. *Chemosphere* 75:417-434
70. Fürst Z. (2004). *Farmakológia.: Medicina Könyvkiadó Zrt, Budapest*
71. Helenkár A, Sebők Á, Zárny G, Molnár-Perl I, Vasánits-Zsigrai A. (2010) The role of the acquisition methods in the analysis of the non-steroidal anti-inflammatory drugs in Danube River by gas chromatography - mass spectrometry. *Talanta* 82:600-607
72. Pal A, Gin KY-H, Lin AY-C, Reinhard M. (2010) Impacts of emerging organic contaminants on freshwater resources: Review of recent occurrences, sources, fate and effects. *Sci Tot Environ* 408:6062-6069
73. Roberts PH, Thomas KV. (2006) The occurrence of selected pharmaceuticals in wastewater effluent and surface waters of the lower Tyne catchment. *Sci Tot Environ* 356:143-153

74. Zuccato E, Castiglioni S, Fanelli R. (2005) Identification of the pharmaceuticals for human use contaminating the Italian aquatic environment. *J Hazard Mater* 122:205-209
75. Gabet-Giraud V, Miège C, Choubert JM, Ruel SM, Coquery M. (2010) Occurrence and removal of estrogens and beta blockers by various processes in wastewater treatment plants. *Sci Tot Environ* 408:4257-4269
76. Larsen TA, Lienert J, Joss A, Siegrist H. (2004) How to avoid pharmaceuticals in the aquatic environment. *J Biotechnol* 113:295-304
77. Oppenländer T, Walddörfer C, Burgbacher J, Kiermeier M, Lachner K, Weinschrott H. (2005) Improved vacuum-UV (VUV)-initiated photomineralization of organic compounds in water with a xenon excimer flow-through photoreactor. *Chemosphere* 60:302-309
78. Vogna D, Marotta R, Napolitano A, Andreozzi R, d'Ischia M. (2004) Advanced oxidation of the pharmaceutical drug diclofenac with UV/H₂O₂ and ozone. *Water Res* 38:414-422
79. Giri R, Ozaki H, Ota S, Takanami R, Taniguchi S. (2010) Degradation of common pharmaceuticals and personal care products in mixed solutions by advanced oxidation techniques. *Int J Environ Sci Tech* 7:251-260
80. Pereira VJ, Weinberg HS, Linden KG, Singer PC. (2007) UV Degradation Kinetics and Modeling of Pharmaceutical Compounds in Laboratory Grade and Surface Water via Direct and Indirect Photolysis at 254 nm. *Environ Sci Technol* 41:1682-1688
81. Andreozzi R, Caprio V, Marotta R, Vogna D. (2003) Paracetamol oxidation from aqueous solutions by means of ozonation and H₂O₂/UV system. *Water Res* 37:993-1004
82. Xekoukoulotakis NP, Xinidis N, Chroni M, Mantzavinos D, Venieri D, et al. (2010) UV-A/TiO₂ photocatalytic decomposition of erythromycin in water: Factors affecting mineralization and antibiotic activity. *Catal Today* 151:29-33
83. Andreozzi R, Canterino M, Giudice RL, Marotta R, Pinto G, Pollio A. (2006) Lincomycin solar photodegradation, algal toxicity and removal from wastewaters by means of ozonation. *Water Res* 40:630-638

84. Beltrán FJ, Aguinaco A, García-Araya JF, Oropesa A. (2008) Ozone and photocatalytic processes to remove the antibiotic sulfamethoxazole from water. *Water Res* 42:3799-3808
85. Adams C, Wang Y, Loftin K, Meyer M. (2002) Removal of antibiotics from surface and distilled water in conventional water treatment processes. *J Env Eng* 128:253-260
86. Benner J, Salhi E, Ternes T, von Gunten U. (2008) Ozonation of reverse osmosis concentrate: Kinetics and efficiency of beta blocker oxidation. *Water Res* 42:3003-3012
87. Huber MM, Göbel A, Joss A, Hermann N, Löffler D, McArdell CS, Ried A, Siegrist H, Ternes TA. (2005) Oxidation of Pharmaceuticals during Ozonation of Municipal Wastewater Effluents: A Pilot Study. *Env Sci Technol* 39:4290-4299
88. Schmitt-Jansen M, Bartels P, Adler N, Altenburger R. (2007) Phytotoxicity assessment of diclofenac and its phototransformation products. *Anal Bioanal Chem* 387:1389-1396
89. Rizzo L. (2011) Bioassays as a tool for evaluating advanced oxidation processes in water and wastewater treatment. *Water Res* 45:4311-4340
90. Allan IJ, Vrana B, Greenwood R, Mills GA, Roig B, Gonzalez C. (2006) A “toolbox” for biological and chemical monitoring requirements for the European Union's Water Framework Directive. *Talanta* 69:302-3
91. Deng A, Himmelsbach M, Zhu Q-Z, Frey S, Sengl M, Buchberger R, Niessner R, Knopp D. (2003) Residue Analysis of the Pharmaceutical Diclofenac in Different Water Types Using ELISA and GC–MS. *Environ Sci Technol* 37:3422-3429
92. Campanella L, Di Persio G, Pintore M, Tonnina D, Caretto N, Martini E, Lelo D. (2009) Determination of nonsteroidal anti-Inflammatory drugs (NSAIDs) in milk and fresh cheese based on the inhibition of cyclooxygenase. *Sensors* 13:17
93. Giaever I, Keese CR. (1993) A morphological biosensor for mammalian cells. *Nature* 366:591-592
94. Brennan LM, Widder MW, Lee LEJ, van der Schalie WH. (2012) Long-term storage and impedance-based water toxicity testing capabilities of fluidic biochips seeded with RTgill-W1 cells. *Toxicol in Vitro* 26:736-745

95. Curtis TM, Widder MW, Brennan LM, Schwager SJ, van der Schalie WH, Fey J, Salazar N, (2009) A portable cell-based impedance sensor for toxicity testing of drinking water. *Lab Chip* 9:2176-2183
96. Vasseur P, Cossu-Leguille C. (2003) Biomarkers and community indices as complementary tools for environmental safety. *Environ Int* 28:711-717
97. Parolini M, Binelli A, Cogni D, Provini A. (2010) Multi-biomarker approach for the evaluation of the cyto-genotoxicity of paracetamol on the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Chemosphere* 79:489-498
98. Farré M, Barceló D. (2003) Toxicity testing of wastewater and sewage sludge by biosensors, bioassays and chemical analysis. *Trends Anal Chem* 22:299-310
99. Bae MJ, Park YS. (2013). Biological early warning system based on the response of aquatic organisms to disturbances. *Sci Tot Environ* 466-467C:635-649
100. Gerhardt A. (2007) Aquatic Behavioral Ecotoxicology—Prospects and Limitations. *Hum Ecol Risk Assess* 13:481-491
101. Lipnick R, Watson K, Strausz A. (1987) A QSAR study of the acute toxicity of some industrial organic chemicals to goldfish. Narcosis, electrophile and proelectrophile mechanisms. *Xenobiotica* 17:1011-1025
102. Wayne Schultz T, Holcombe GW, Phipps GL. (1986) Relationships of quantitative structure-activity to comparative toxicity of selected phenols in the *Pimephales promelas* and *Tetrahymena pyriformis* test systems. *Ecotoxicol Environl Safety* 12:146-153
103. Cleuvers M. (2003) Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicol Lett* 142:185-194
104. Sandermann H. (1993) Induction of lipid-protein mismatch by xenobiotics with general membrane targets. *Biochim Biophys Acta - Biomembranes* 1150:130-133
105. Franks N, Lieb W. (1990). Mechanisms of general anesthesia. *Environmental health perspectives*:199-205
106. Rudzok S, Krejčí S, Graebisch C, Herbarth O, Mueller A, Bauer M. (2011). Toxicity profiles of four metals and 17 xenobiotics in the human hepatoma cell line HepG2 and the protozoa *Tetrahymena pyriformis*—A comparison. *Environ Toxicol* 26:171-186

107. Escher BI, Bramaz N, Eggen RI, Richter M. (2005) In vitro assessment of modes of toxic action of pharmaceuticals in aquatic life. *Environ Sci Technol* 39:3090-3100
108. Dunzendorfer S, Wiedermann C. (2000) Modulation of neutrophil migration and superoxide anion release by metoprolol. *J Mol Cell Cardiol* 32:915-924
109. Sozzani S, Agwu D, McCall C, O'flaherty J, Schmitt J, Kent JD, McPhail LC. (1992) Propranolol, a phosphatidate phosphohydrolase inhibitor, also inhibits protein kinase C. *J Biol Chem* 267:20481-20488
110. Altenburger R, Backhaus T, Boedeker W, Faust M, Scholze M, Grimme LH. (2000) Predictability of the toxicity of multiple chemical mixtures to *Vibrio fischeri*: Mixtures composed of similarly acting chemicals. *Environ Toxicol Chem* 19:2341-2347
111. Altenburger R, Nendza M, Schüürmann G. (2003) Mixture toxicity and its modeling by quantitative structure-activity relationships. *Environ Toxicol Chem* 22:1900-1915
112. Stratton G. (1983) Interaction effects of permethrin and atrazine combinations towards several nontarget microorganisms. *Bull. Environ Contam Toxicol* 31:297-303
113. Gallego A, Martín-González A, Ortega R, Gutiérrez JC. (2007) Flow cytometry assessment of cytotoxicity and reactive oxygen species generation by single and binary mixtures of cadmium, zinc and copper on populations of the ciliated protozoan *Tetrahymena thermophila*. *Chemosphere* 68:647-661
114. Rudzok S, Schlink U, Herbarth O, Bauer M. (2010) Measuring and modeling of binary mixture effects of pharmaceuticals and nickel on cell viability/cytotoxicity in the human hepatoma derived cell line HepG2. *Toxicol Appl Pharmacol* 244:336-343
115. Gerhardt A, Ud-Daula A, Schramm K-W. (2010) *Tetrahymena* spp.(Protista, Ciliophora) as test species in rapid multilevel ecotoxicity tests. *Acta Protozool* 49:271
116. Csaba G, Németh G. (1980) Effect of hormones and their precursors on protozoa—the selective responsiveness of *tetrahymena*. *Comp Biochem Physiol - B: Comp Biochem* 65:387-390

117. Köhidai L, Csaba G. (1995) Effects of the mammalian vasoconstrictor peptide, endothelin-1, on *Tetrahymena pyriformis* GL, and the immunocytological detection of endogenous endothelin-like activity. *Comp Biochem Physiol-C: Pharmacol Toxicol Endocrinol* 111:311-316
118. Schultz TW, Cronin MT, Netzeva TI, Aptula AO. (2002) Structure-toxicity relationships for aliphatic chemicals evaluated with *Tetrahymena pyriformis*. *Chem Res Toxicol* 15:1602-1609
119. Cronin MT, Schultz TW. (2001) Development of quantitative structure-activity relationships for the toxicity of aromatic compounds to *Tetrahymena pyriformis*: comparative assessment of the methodologies. *Chem Res Toxicol* 14:1284-1295
120. Cronin M, Gregory B, Schultz TW. (1998) Quantitative structure-activity analyses of nitrobenzene toxicity to *Tetrahymena pyriformis*. *Chem Res Toxicol* 11:902-908
121. Russell WMS, Burch RL, Hume CW. (1959) The principles of humane experimental technique. Universities Federation For Animal Welfare
122. Richardson D, Dorris T, Burks S, Browne R, Higgins M, Leach F. (1977) Evaluation of a cell culture assay for determination of water quality of oil-refinery effluents. *Bull Environ Contam Toxicol* 18:683-690
123. Schirmer K. (2006) Proposal to improve vertebrate cell cultures to establish them as substitutes for the regulatory testing of chemicals and effluents using fish. *Toxicol* 224:163-183
124. Klemola K, Pearson J, Lindstrom-Seppä P. (2007) Evaluating the toxicity of reactive dyes and dyed fabrics with the HaCaT cytotoxicity test. *AUTEX* 7:217-223
125. Reichelt J. (2007) Mechanotransduction of keratinocytes in culture and in the epidermis. *Eur J Cell Biol* 86:807-816
126. Knasmüller S, Mersch-Sundermann V, Kevekordes S, Darroudi F, Huber WW, Hoelzl C, Bichler J, Majer BJ. (2004) Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge. *Toxicology* 198:315-328

127. Westerink WMA, Schoonen WGEJ. (2007) Phase II enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells. *Toxicol in Vitro* 21:1592-1602
128. Soule H, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M. (1973) A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 51:1409-1416
129. Gutendorf B, Westendorf J. (2001) Comparison of an array of in vitro assays for the assessment of the estrogenic potential of natural and synthetic estrogens, phytoestrogens and xenoestrogens. *Toxicology* 166:79-89
130. Vargovaacute M, Zeljenkovaacute D, Gajdovaacute M. (1995) Estrogenic effects of environmental chemicals. *Toxicol Lett* 78:82
131. Fischer E, Speier A. (1895) Darstellung der ester. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* 28:3252-3258
132. Szabó RK, Megyeri C, Illés E, Gajda-Schrantz K, Mazellier P, Dombi A. (2011) Phototransformation of ibuprofen and ketoprofen in aqueous solutions. *Chemosphere* 84:1658-1663
133. Kőhidai L. (1995) Method for determination of chemoattraction in *Tetrahymena pyriformis*. *Curr Microbiol* 30:251-253
134. Sáfár O, Kőhidai L, Hegedűs A. (2011) Time-delayed model of the unbiased movement of *Tetrahymena Pyriformis*. *Period Math Hung* 63:215-225
135. Powis G, Bonjouklian R, Berggren MM, Gallegos A, Abraham R, Ashendel C, Zalkow L, Matter WF, Dodge J, Grindey G. (1994) Wortmannin, a potent and selective inhibitor of phosphatidylinositol-3-kinase. *Cancer res* 54:2419-2423
136. Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY, Brown RF. (1994) A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J Biol Chem* 269:5241-5248
137. Walker EH, Pacold ME, Perisic O, Stephens L, Hawkins PT, Wymann MP, Williams RL. (2000) Structural Determinants of Phosphoinositide 3-Kinase Inhibition by Wortmannin, LY294002, Quercetin, Myricetin, and Staurosporine. *Mol Cell* 6:909-919
138. Mosmann T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55-63

139. Nakayama GR, Caton MC, Nova MP, Parandoosh Z. (1997) Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro. *J Immunol Methods* 204:205
140. Giaever I, Keese CR. (1984) Monitoring fibroblast behavior in tissue culture with an applied electric field. *PNAS* 81:3761-3764
141. Trappmann B, Gautrot JE, Connelly JT, Strange DGT, Li Y, Oyen ML, Cohen SMA, Boehm H, Li B, Vogel V, Spatz JP, Watt FM, Huck WTS. (2012) Extracellular-matrix tethering regulates stem-cell fate. *Nat Mater* 11:642-649
142. Kuo C-HR, Xian J, Brenton JD, Franze K, Sivanian E. (2012) Complex Stiffness Gradient Substrates for Studying Mechanotactic Cell Migration. *Adv Mater* 24:6059-6064
143. Howell DC. (2011). *Statistical methods for psychology*. Cengage Learning
144. Eriksson E, Auffarth K, Eilersen AM, Henze M, Ledin A. (2003) Household chemicals and personal care products as sources for xenobiotic organic compounds in grey wastewater. *Water SA* 29:135-146
145. Kumari A, Mahapatra P, Garlapati VK, Banerjee R, Dasgupta S. (2009) Lipase mediated isoamyl acetate synthesis in solvent-free system using vinyl acetate as acyl donor. *Food Technol Biotechnol* 47:13
146. Dudareva N, Negre F, Nagegowda DA, Orlova I. (2006) Plant volatiles: recent advances and future perspectives. *Crit Rev Plant Sci* 25:417-440
147. Fishilevich E, Domingos AI, Asahina K, Naef F, Vosshall LB, Louis M. (2005) Chemotaxis Behavior Mediated by Single Larval Olfactory Neurons in *Drosophila*. *Current Biol* 15:2086-2096
148. Luo L, Gabel CV, Ha H-I, Zhang Y, Samuel AD. (2008) Olfactory behavior of swimming *C. elegans* analyzed by measuring motile responses to temporal variations of odorants. *J Neurophysiol* 99:2617-2625
149. Matsui A, Go Y, Niimura Y. (2010) Degeneration of olfactory receptor gene repertoires in primates: no direct link to full trichromatic vision. *Mol Biol Evol* 27:1192-200
150. Swaney KF, Huang C-H, Devreotes PN. (2010) Eukaryotic chemotaxis: a network of signaling pathways controls motility, directional sensing, and polarity. *Ann Rev Biophysics* 39:265-289

151. Boekhoff I, Tareilus E, Strotmann J, Breer H. (1990) Rapid activation of alternative second messenger pathways in olfactory cilia from rats by different odorants. *The EMBO journal* 9:2453
152. Kőhidai L, Lemberkovics É, Csaba G. (1995) Molecule dependent chemotactic responses of *Tetrahymena pyriformis* elicited by volatile oils. *Acta Protozool* 34:181-185
153. Rodgers LF, Markle KL, Hennessey TM. (2008) Responses of the ciliates *Tetrahymena* and *Paramecium* to vertebrate odorants and tastants. *J Eukaryot Microbiol* 55:27-33
154. Li Z, Jiang H, Xie W, Zhang Z, Smrcka AV, Wu D. (2000) Roles of PLC-2 and-3 and PI3K in chemoattractant-mediated signal transduction. *Science Signaling* 287:1046
155. Smit MJ, Verdijk P, van der Raaij-Helmer EM, Navis M, Hensbergen PJ, Leurs R, Tensen CP. (2003) CXCR3-mediated chemotaxis of human T cells is regulated by a Gi-and phospholipase C-dependent pathway and not via activation of MEK/p44/p42 MAPK nor Akt/PI-3 kinase. *Blood* 102:1959-1965
156. Crane M, Watts C, Boucard T. (2006) Chronic aquatic environmental risks from exposure to human pharmaceuticals. *Sci Tot Environ* 367:23-41
157. Cleuvers M. (2005). Initial risk assessment for three β -blockers found in the aquatic environment. *Chemosphere* 59:199-205
158. Ferrari B, Mons R, Vollat B, Fraysse B, Paxéaus N, Guidice RL, Pollio A, Garric J. (2004) Environmental risk assessment of six human pharmaceuticals: Are the current environmental risk assessment procedures sufficient for the protection of the aquatic environment? *Environ Toxicol Chem* 23:1344-1354
159. Huggett DB, Brooks BW, Peterson B, Foran CM, Schlenk D. (2002) Toxicity of Select Beta Adrenergic Receptor-Blocking Pharmaceuticals (B-Blockers) on Aquatic Organisms. *Archi Environ Contam Toxicol* 43:229-235
160. Backhaus T, Sumpter J, Blanck H. (2008) On the ecotoxicology of pharmaceutical mixtures. In *Pharmaceuticals in the Environment*. Springer: 257-76
161. Parvez S, Venkataraman C, Mukherji S. (2008) Toxicity assessment of organic contaminants: Evaluation of mixture effects in model industrial mixtures using 2n full factorial design. *Chemosphere* 73:1049-1055

162. Zhang Y, Geißen S-U, Gal C. (2008) Carbamazepine and diclofenac: removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies. *Chemosphere* 73:1151-1161
163. Green RE, Newton IAN, Shultz S, Cunningham AA, Gilbert M, Pain DJ, Prakash V. (2004) Diclofenac poisoning as a cause of vulture population declines across the Indian subcontinent. *J App Ecol* 41:793-800
164. Oaks JL, Gilbert M, Virani MZ, Watson RT, Meteyer CU, Rideout BA, Shivaprasad HL, Ahmed S, Chaudhry MJI, Arshad M. (2004) Diclofenac residues as the cause of vulture population decline in Pakistan. *Nature* 427:630-633
165. Clara M, Kreuzinger N, Strenn B, Gans O, Kroiss H. (2005) The solids retention time—a suitable design parameter to evaluate the capacity of wastewater treatment plants to remove micropollutants. *Water Res* 39:97-106
166. Oulton RL, Kohn T, Cwiertny DM. (2010) Pharmaceuticals and personal care products in effluent matrices: a survey of transformation and removal during wastewater treatment and implications for wastewater management. *J Env Monitor* 12:1956-1978
167. Caminada D, Escher C, Fent K. (2006) Cytotoxicity of pharmaceuticals found in aquatic systems: comparison of PLHC-1 and RTG-2 fish cell lines. *Aquatic Toxicol* 79:114-23
168. Schnell S, Bols NC, Barata C, Porte C. (2009) Single and combined toxicity of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) on the rainbow trout liver cell line RTL-W1. *Aquatic Toxicol* 93:244-252
169. Jones O, Voulvoulis N, Lester J. (2001) Human pharmaceuticals in the aquatic environment a review. *Environ Technol* 22:1383-1394
170. Thibaut R, Porte C. (2008) Effects of fibrates, anti-inflammatory drugs and antidepressants in the fish hepatoma cell line PLHC-1: cytotoxicity and interactions with cytochrome P450 1A. *Toxicol in Vitro* 22:1128-1135
171. Feng J, Tang Y, Xu Y, Sun Q, Liao F, Han D. (2013) Substrate stiffness influences the outcome of antitumor drug screening in vitro. *Clin Hemorheol Micro*
172. Liao F, Li M, Han D, Cao J, Chen K.(2006) Biomechanopharmacology: a new borderline discipline. *Trends Pharmacol Sci* 27:287-289

173. Nemir S, West JL. (2010) Synthetic materials in the study of cell response to substrate rigidity. *Ann Biomed Eng* 38:2-20
174. Provenzano P, Inman D, Eliceiri K, Keely P. (2009) Matrix density-induced mechanoregulation of breast cell phenotype, signaling and gene expression through a FAK-ERK linkage. *Oncogene* 28:4326-4343
175. Sun HB. (2010) Mechanical loading, cartilage degradation, and arthritis. *Ann N Y Acad Sci* 1211:37-50
176. Bentley A, Atkinson A, Jezek J, Rawson DM. (2001) Whole cell biosensors — electrochemical and optical approaches to ecotoxicity testing. *Toxicol in Vitro* 15:469-475
177. Kőhidai L, Láng O, Csaba G. (2003) Chemotactic-range-fitting of amino acids and its correlations to physicochemical parameters in *Tetrahymena pyriformis*-evolutionary consequences. *Cell Mol Biol* 49:487-495
178. Seibert H, Kolossa M, Wassermann O. (1989) Bovine spermatozoa as an in vitro model for studies on the cytotoxicity of chemicals: effects of chlorophenols. *Cell Biol Toxicol* 5:315-330
179. Wu C, Fry CH, Henry JA. (1997) Membrane toxicity of opioids measured by protozoan motility. *Toxicology* 117:35-44
180. Larsson MC, Stensmyr MC, Bice SB, Hansson BS. (2003) Attractiveness of fruit and flower odorants detected by olfactory receptor neurons in the fruit chafer *Pachnoda marginata*. *J Chem Ecol* 29:1253-1268
181. Burne THJ, Rogers LJ. (2002) Chemosensory input and lateralization of brain function in the domestic chick. *Behaviour Brain Res* 133:293-300
182. Carle SA, Averill AL, Rule GS, Reissig WH, Roelofs WL. (1987) Variation in host fruit volatiles attractive to apple maggot fly, *Rhagoletis pomonella*. *J Chem Ecol* 13:795-805
183. Delay R, Restrepo D. (2004) Odorant responses of dual polarity are mediated by cAMP in mouse olfactory sensory neurons. *J Neurophysiol* 92:1312-1319
184. Leinders-Zufall T, Greer CA, Shepherd GM, Zufall F. (1998) Imaging odor-induced calcium transients in single olfactory cilia: specificity of activation and role in transduction. *Journal Neurosci* 18:5630-5639

185. Pun RY, Kleene SJ. (2002) Outward currents in olfactory receptor neurons activated by odorants and by elevation of cyclic AMP. *Cell Biochem Biophys* 37:15-26
186. Watt WC, Storm DR. (2001) Odorants stimulate the ERK/mitogen-activated protein kinase pathway and activate cAMP-response element-mediated transcription in olfactory sensory neurons. *J Biol Chem* 276:2047-2052
187. Klasen K, Corey E, Kuck F, Wetzel C, Hatt H, Ache B. (2010) Odorant-stimulated phosphoinositide signaling in mammalian olfactory receptor neurons. *Cell signal* 22:150-157
188. Ronnett GV, Moon C. (2002) G proteins and olfactory signal transduction. *Annual Rev Physiol* 64:189-222
189. Cleuvers M. (2004) Mixture toxicity of the anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, naproxen, and acetylsalicylic acid. *Ecotoxicol Environl Safety* 59:309-315
190. Garrett CE, Coderre JA, Meek TD, Garvey EP, Claman DM, Beverley SM, Santi DV. (1984) A bifunctional thymidylate synthetase-dihydrofolate reductase in protozoa. *Mol Biochem Parasitol* 11:257-265
191. Hokama Y, Yokochi L, Abad M, Shigemura L, Kimura LH, Okano C, Chou SC. (1982) Presence of prostaglandins (PGs) in *Tetrahymena pyriformis*, GL and the effect of aspirin. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 38:169
192. Blum J. (1967) An adrenergic control system in *Tetrahymena*. *PNAS* 58:81
193. Locatelli L, Sacerdote P, Mantegazza P, Panerai A. (1993) Effect of ibuprofen and diclofenac on the chemotaxis induced by substance P and transforming growth factor- β on human monocytes and polymorphonuclear cells. *Int J Immunopharmacol* 15:833-838
194. Djanani A, Kaneider NC, Meierhofer C, Sturn D, Duzendorfer S, Allmeier H, Wiedermann CJ. (2003). Inhibition of neutrophil migration and oxygen free radical release by metipranolol and timolol. *Pharmacology* 68:198-203
195. Oda H, Kadota J-i, Kohno S, Hara K. (1994) Erythromycin inhibits neutrophil chemotaxis in bronchoalveoli of diffuse panbronchiolitis. *CHEST J* 106:1116-1123

196. Levesque L, C-Gaudreault R, Marceau F. (1992) Comparison of two classes of non-peptide drugs as antagonists of neutrophil receptors for f-Met-Leu-Phe: pyrazolons and iodinated radiographic contrast agents. *Biochem Pharmacol* 43:553-560
197. Calabrese EJ. (2005) Hormetic dose-response relationships in immunology: occurrence, quantitative features of the dose response, mechanistic foundations, and clinical implications. *CRC Crit Rev Toxicol* 35:89-295
198. Calabrese EJ. (2005) Paradigm lost, paradigm found: the re-emergence of hormesis as a fundamental dose response model in the toxicological sciences. *Environ Pollut* 138:378-411
199. Köhidai L, Csaba G. (1995) Effects of the mammalian vasoconstrictor peptide, endothelin-1, on *Tetrahymena pyriformis* GL, and the immunocytological detection of endogenous endothelin-like activity. *Compe Biochem Physiol C: Pharmacol Toxicol Endocrinol* 111:311-316
200. Takeshi S, Masashi Y, Tomoh M. (1992) Molecular characterization of endothelin receptors. *Trend Pharmacol Sci* 13:103-108
201. Wilkinson P, Lackie J. (1983) The influence of contact guidance on chemotaxis of human neutrophil leukocytes. *Exp Cell Res* 145:255-264
202. Christensen AM, Ingerslev F, Baun A. (2006) Ecotoxicity of mixtures of antibiotics used in aquacultures. *Environ Toxicol Chem* 25:2208-2215
203. Pomati F, Castiglioni S, Zuccato E, Fanelli R, Vigetti D, Rossetti C, Calamari D. (2006) Effects of a Complex Mixture of Therapeutic Drugs at Environmental Levels on Human Embryonic Cells. *Environ Sci Technol* 40:2442-2447
204. Pomati F, Orlandi C, Clerici M, Luciani F, Zuccato E. (2008) Effects and Interactions in an Environmentally Relevant Mixture of Pharmaceuticals. *Toxicol Sci* 102:129-137
205. Andreozzi R, Campanella L, Fraysse B, Garric J, Gonnella A, Guidice LR, Marotta R, Pinto G, Pollio A. (2004) Effects of advanced oxidation processes(AOPs) on the toxicity of a mixture of pharmaceuticals. *Water Sci Technol* 50:23-28

206. Yu H, Nie E, Xu J, Yan S, Cooper WJ, Song W. (2013) Degradation of Diclofenac by Advanced Oxidation and Reduction Processes: Kinetic Studies, Degradation Pathways and Toxicity Assessments. *Water Res* 47:1909-1918
207. Sosnin EA, Oppenländer T, Tarasenko VF. (2006). Applications of capacitive and barrier discharge excilamps in photoscience. *J Photochem Photobiol C: Photochem Rev* 7:145-163
208. Hong HN, Kim HN, Park KS, Lee S-K, Gu MB. (2007) Analysis of the effects diclofenac has on Japanese medaka (*Oryzias latipes*) using real-time PCR. *Chemosphere* 67:2115-2121
209. Laville N, Aït-Aïssa S, Gomez E, Casellas C, Porcher JM. (2004) Effects of human pharmaceuticals on cytotoxicity, EROD activity and ROS production in fish hepatocytes. *Toxicology* 196:41-55
210. Götz C, Pfeiffer R, Tigges J, Blatz V, Jäckh C, Freytag EM, Fabian E, Landsiedel R, Merk HF, Krutmann J. (2012) Xenobiotic metabolism capacities of human skin in comparison with a 3D epidermis model and keratinocyte- based cell culture as in vitro alternatives for chemical testing: activating enzymes (Phase I). *Exp Dermatol* 21:358-363
211. Skupinska K, Misiewicz I, Kasprzycka-Guttman T. (2007) A comparison of the concentration–effect relationships of PAHs on CYP1A induction in HepG2 and Mcf7 cells. *Arch Toxicol* 81:183-200
212. Xing JZ, Zhu L, Gabos S, Xie L. (2006) Microelectronic cell sensor assay for detection of cytotoxicity and prediction of acute toxicity. *Toxicol In Vitro* 20:995-1004
213. Sese N, Cole M, Tawil B. (2010) Proliferation of human keratinocytes and cocultured human keratinocytes and fibroblasts in three-dimensional fibrin constructs. *Tissue Eng A* 17:429-437
214. Maloney JM, Walton EB, Bruce CM, Van Vliet KJ. (2008) Influence of finite thickness and stiffness on cellular adhesion-induced deformation of compliant substrata. *Phys Rev E* 78:041923
215. Sen S, Engler AJ, Discher DE. (2009). Matrix strains induced by cells: computing how far cells can feel. *Cell Mol Bioeng* 2:39-48

216. Paszek MJ, Zahir N, Johnson KR, Lakins JN, Rozenberg GI, Gefen A, Reinhart-King CA, Margulies SS, Dembo M, Boettiger D. (2005) Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer Cell* 8:241-254
217. Paszek MJ, Weaver VM. (2004) The tension mounts: mechanics meets morphogenesis and malignancy. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 9:325-342
218. Indra I, Benigno KA. (2011) An in vitro correlation of metastatic capacity, substrate rigidity, and ECM composition. *J Cell Biochem* 112:3151-3158
219. Sennoune SR, Bakunts K, Martínez GM, Chua-Tuan JL, Kebir Y, Attaya MN, Martínez-Zaguilán R. (2004) Vacuolar H⁺-ATPase in human breast cancer cells with distinct metastatic potential: distribution and functional activity. *Am J Physiol Cell Physiol* 286:C1443-C52
220. Yang X, Welch DR, Phillips KK, Weissman BE, Wei LL. (1997) KAI 1, a putative marker for metastatic potential in human breast cancer. *Cancer Lett* 119:149-155
221. Shafie SM, Liotta LA. (1980) Formation of metastasis by human breast carcinoma cells (MCF-7) in nude mice. *Cancer Lett* 11:81-87
222. Georges PC, Janmey PA. (2005) Cell type-specific response to growth on soft materials. *J Appl Physiol* 98:1547-1553
223. Almazan G, Afar D, Bell J. (1993) Phosphorylation and disruption of intermediate filament proteins in oligodendrocyte precursor cultures treated with calyculin A. *J Neurosci Res* 36:163-172
224. Eckes B, Dogic D, Colucci-Guyon E, Wang N, Maniotis A, Ingber D, Merckling A, Langa F, Aumailley M, Delouvee A, Kotliansky V, Babinet C, Krieg T. (1998) Impaired mechanical stability, migration and contractile capacity in vimentin-deficient fibroblasts. *J Cell Sci* 111:1897-907
225. Gilles C, Polette M, Zahm J-M, Tournier J-M, Volders L, Foidart JM, Birembaut P. (1999) Vimentin contributes to human mammary epithelial cell migration. *J Cell Sci* 112:4615-4625
226. Chen CS. (2008) Mechanotransduction – a field pulling together? *J Cell Sci* 121:3285-3292

227. Liu LY, Hu CL, Ma LJ, Zhang ZH, Mei YA. (2004) ET-1 inhibits B-16 murine melanoma cell migration by decreasing K⁺ currents. *Cell Motil Cytoskel* 58:127-136
228. Chen J, Hoffman BB, Isseroff RR. (2002) β -adrenergic receptor activation inhibits keratinocyte migration via a cyclic adenosine monophosphate-independent mechanism. *J Inv Dermatol* 119:1261-1268
229. Pullar CE, Grahn JC, Liu W, Isseroff RR. (2006) β 2-Adrenergic receptor activation delays wound healing. *FASEB J* 20:76-86

9. Saját publikációk jegyzéke

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 89:592-601 **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 **IF₂₀₁₂=3,258**

Az értekezéstől független témában megjelent saját 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**

10. Köszönetnyilvánítás

Köszönöm témavezetőmnek **Dr. Kőhidai Lászlónak** az érdekes téma felvetését, valamint a közös munkánk során nyújtott töretlen szakmai és emberi útmutatását.

Köszönöm **Prof. Szőke Évának** a Gyógyszertudományok Doktori Iskola vezetőjének a PhD tanulmányaim során nyújtott támogatását, amely nélkülözhetetlen segítség volt munkám tárgyi és emberi feltételeinek megteremtésében.

Szeretném megköszönni **Dr. Láng Orsolyának**, hogy szakmai tanácsaival, személyes példájával és testvéri szeretetével mindvégig támogatott az ezen értekezés elkészüléséig vezető utamon.

Köszönöm **Prof. Falus András** volt, és **Prof. Buzás Edit** jelenlegi intézetvezetőnek, hogy lehetővé tették számomra, hogy a Genetikai, Sejt-és Immunbiológiai Intézetben folytathassam doktori kutató munkámat, továbbá az **Intézet valamennyi dolgozójának** szeretném a hálámat kifejezni, amiért befogadtak és hol értékes szakmai meglátásaikkal, hol baráti szavaikkal segítették munkámat.

Szeretném köszönetemet nyilvánítani a **Richter Gedeon Vegyészeti Gyár Centenárium Alapítvány** doktorjelölti ösztöndíjért, ill. a **Campus Hungary programnak** valamint a **TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0013** számú pályázatnak, hogy anyagilag hozzájárultak a Cambridge-i Egyetem Cavendish Laboratóriumába tett tanulmányutamhoz.

Köszönetemet szeretném kifejezni az **MTA-ELTE Peptidkémiai Munkacsoportjának**, valamint a **Szegedi Tudományegyetem Műszaki és Anyagtudományi Intézetének**, ill. a **Cambridge-i Egyetem „Biological and Soft Sysytems”** kutatócsoportjának az értékes szakmai együttműködésért.

Köszönet a **Kemotaxis Munkacsoport** valamennyi volt és jelenlegi munkatársának a barátságos, kollegiális légkörért, amelyben dolgozhattam, ill. a szakmai tanácsaikért.

Köszönöm **Dr. Dobozy Ottónak** dolgozatom figyelmes áttekintését és jobbitó szándékú bírálatát.

Köszönettel tartozom a **Doktori Iskola** és **Doktori Titkárság** valamennyi munkatársának, akik munkájukkal hozzájárultak doktori tanulmányaim lefolytatásához.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm **családomnak**, elsősorban férjemnek, szüleimnek és nagyszüleimnek a végtelen szeretetüket és türelmüket, amely nélkül doktori munkám sikeres lezárása elképzelhetetlen lett volna.

11. Fűggelék

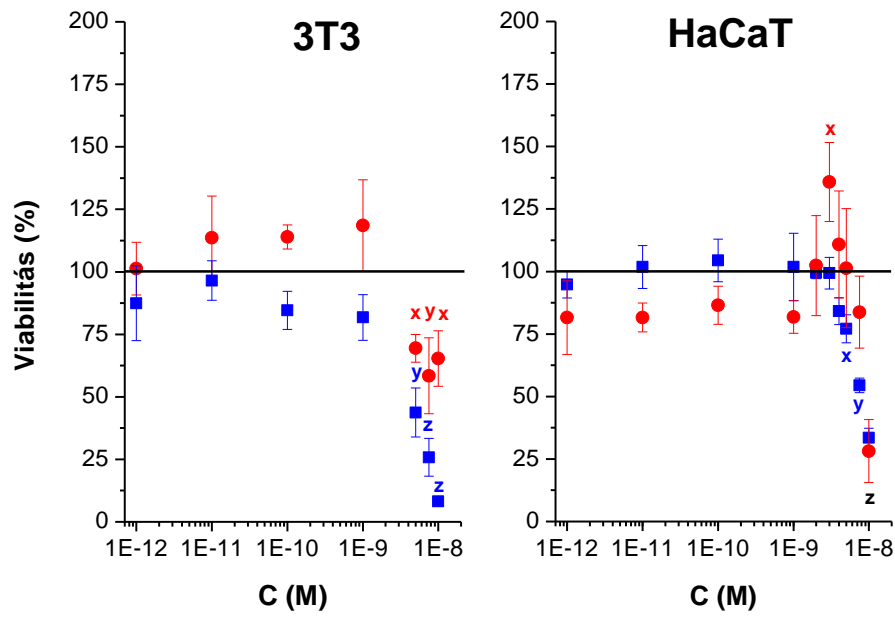
F1. táblázat: A diklofenák O₂-telített környezetben végzett VUV fotolíziséből származó minták kemotaktikus aktivitásának koncentrációfüggése.

t	0,0001 v/v%		0,001 v/v%		0,01 v/v%		0,1 v/v%		1,v/v%	
	Ktx. Ind.	SE	Ktx. Ind.	SE	Ktx. Ind.	SE	Ktx. Ind.	SE	Ktx. Ind.	SE
(s)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
0	79,0 ^y	6,0	54,0 ^z	2,6	70,2 ^z	6,3	47,6 ^z	2,9	50,0 ^z	7,0
10	94,9	7,6	86,1 ^x	10,9	97,7	12,5	63,0 ^z	7,5	74,6 ^y	3,5
20	88,1 ^x	6,4	80,6 ^x	5,0	61,7 ^z	4,1	100,2	3,9	92,1	8,0
40	90,3	5,8	91,9	8,0	94,6	5,6	85,4 ^x	8,3	63,7 ^z	4,2
90	135,2 ^y	7,7	91,4	2,4	92,3	7,8	74,6 ^y	1,8	80,7 ^x	7,3
150	133,3 ^x	13,4	121,1	10,1	79,2 ^y	2,6	75,7 ^y	2,1	97,1	16,6
300	107,5	6,1	122,6 ^x	6,0	106,7	7,6	71,3 ^y	7,4	72,5 ^y	3,8
600	87,0 _x	4,9	93,0	6,5	73,5 ^y	2,4	68,2 ^y	1,8	99,9	6,0
900	98,4	6,0	96,9	2,9	87,3 ^x	6,3	95,0	10,4	77,5 ^y	6,0
1200	122,0 ^x	8,3	136,0 ^y	2,0	83,5 ^x	7,2	114,9	12,8	55,0 ^z	5,5
1500	95,3	3,8	70,5 ^y	7,5	105,6	8,4	59,4 ^z	3,4	89,3	10,9
1800	117,7 ^x	5,8	82,3 ^x	5,8	92,6	7,3	71,5 ^y	4,8	79,9 ^y	8,5
2400	104,4	8,9	128,5 ^x	12,3	80,3 ^x	6,2	87,2 ^x	6,9	96,4	2,0
3000	87,6 _x	4,0	85,1 ^x	9,8	79,8 ^x	5,4	66,8 ^y	8,9	75,5 ^y	5,6
3600	122,2	13,6	93,7	19,9	83,5 ^x	10,4	59,9 ^y	5,0	55,3 ^z	6,2

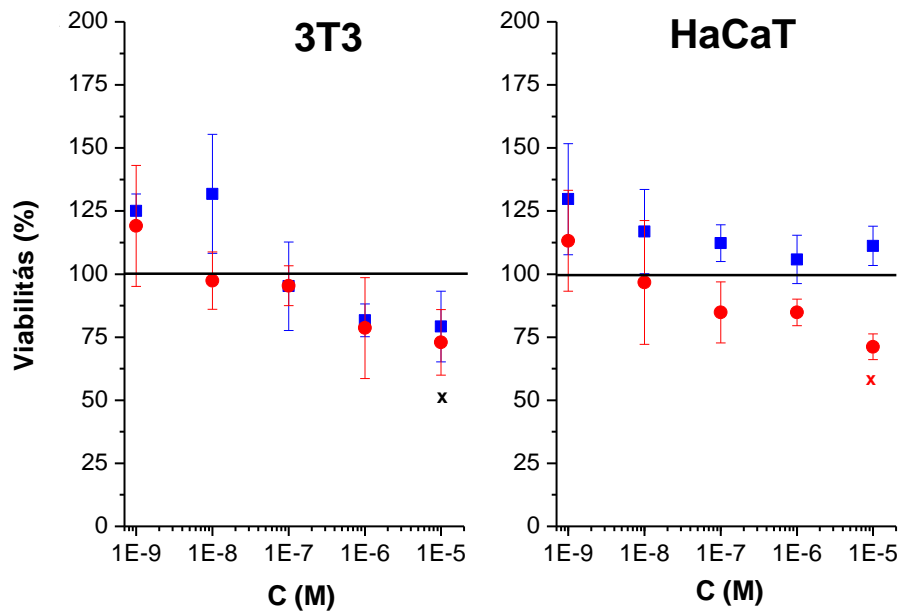
szignifikancia szintek: x<0.05; y<0.01; z<0.001

F2. táblázat: A diklofenák O₂-mentes környezetben végzett VUV fotolíziséből származó minták kemotaktikus aktivitásának koncentrációfüggése.

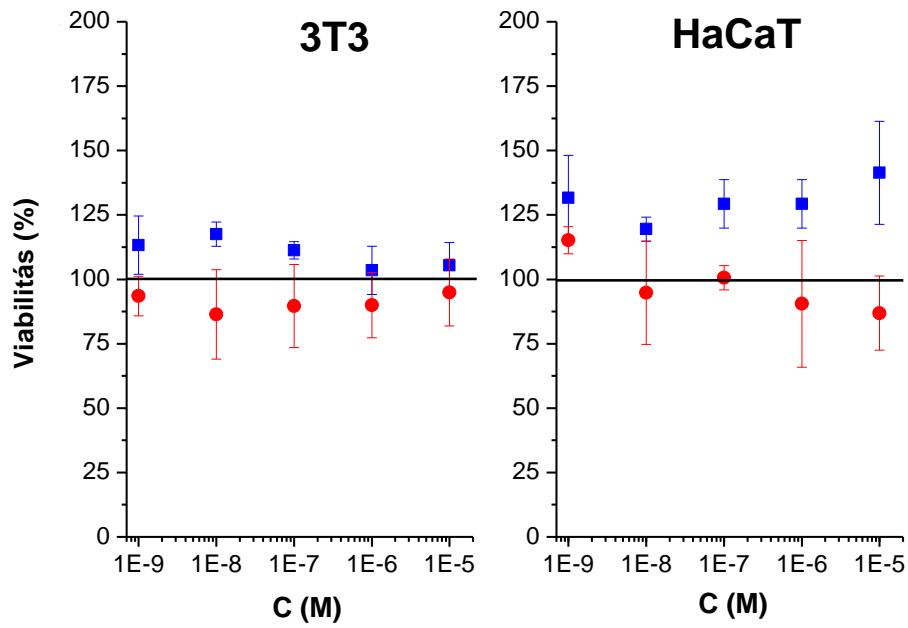
t	0,0001 v/v%		0,001 v/v%		0,01 v/v%		0,1 v/v%		1,v/v%	
	Ktx. Ind.	SE	Ktx. Ind.	SE	Ktx. Ind.	t	Ktx. Ind.	SE	Ktx. Ind.	SE
(s)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(s)	(%)	(%)	(%)	(%)
0	79.0 ^y	6.0	54.0 ^z	2.6	70.2 ^z	6.3	47.6 ^z	2.9	50.0 ^z	7.0
10	84.0 ^y	5.5	85.0 ^x	6.0	76.0 ^z	5.0	96.0	6.5	76.0 ^y	3.5
20	138.0 ^y	7.0	110.0	9.5	121.0 ^x	2.5	99.0	13.0	69.0 ^z	3.5
40	102.0	5.0	117.0	6.0	89.0	8.0	65.0 ^z	4.0	84.0 ^y	1.0
90	72.0 ^z	5.0	69.0 ^z	5.5	65.0 ^z	6.0	59.0 ^z	3.5	48.0 ^z	3.0
150	90.0	7.5	100.0	5.0	77.0 ^z	2.5	81.0 ^x	4.0	68.0 ^z	2.5
300	95.1	3.2	76.5 ^y	9.1	85.2 ^x	9.4	86.5 ^x	6.5	80.4 ^x	5.5
600	107.1	6.5	102.9	3.8	92.4	10.7	89.3	11.2	61.8 ^z	3.4
900	90.9	5.1	89.2	5.6	81.1 ^x	3.9	79.4 ^y	6.1	74.8 ^y	4.8
1200	82.4 ^x	1.7	85.3 ^x	14.2	62.7 ^z	6.9	93.8	5.5	72.8 ^y	4.3
1500	76.3 ^y	3.7	57.9 ^z	1.4	84.7 ^x	11.7	56.8 ^z	7.4	104.4	10.4
1800	85.0 ^x	4.4	100.2	3.5	102.2	6.3	82.5 ^x	8.0	79.7 ^y	6.5
2400	142.5 ^y	13.1	136.7 ^x	10.7	149.7 ^z	6.1	107.3	11.8	58.2 ^z	1.5
3000	111.7	7.0	98.7	3.4	109.2	13.0	75.9 ^y	7.0	83.4 ^x	8.0
3600	92.1	5.0	102.3	3.3	110.2	4.4	90.4	9.5	69.1 ^z	7.0



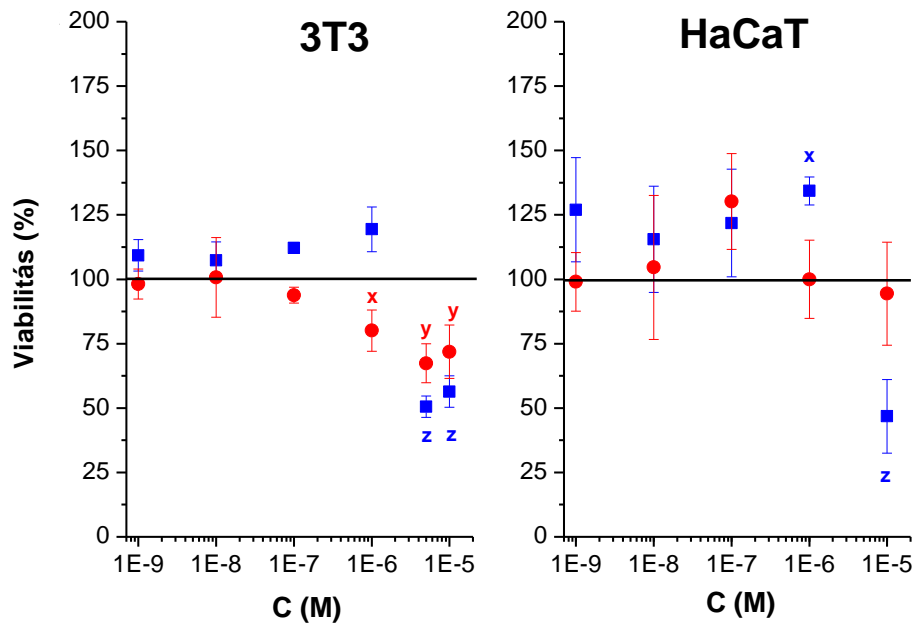
F1. ábra: A citokalazin-B hatása a 3T3 fibroblasztok és a HaCaT keratinociták viabilitására *MTT* és *AlamarBlue* assay-vel vizsgálva



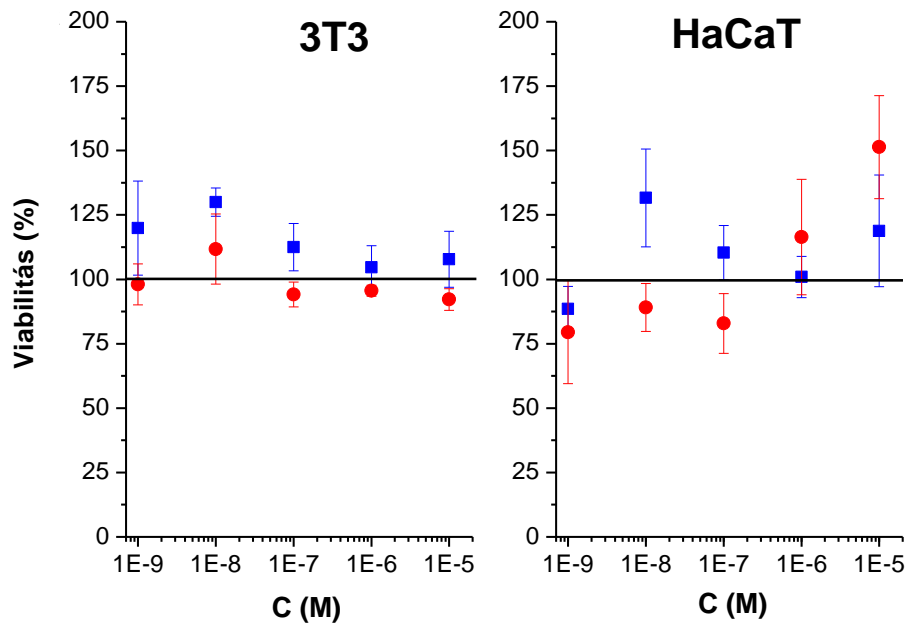
F2. ábra: A citokalazin-D hatása a 3T3 fibroblasztok és a HaCaT keratinociták viabilitására *MTT* és *AlamarBlue* assay-vel vizsgálva



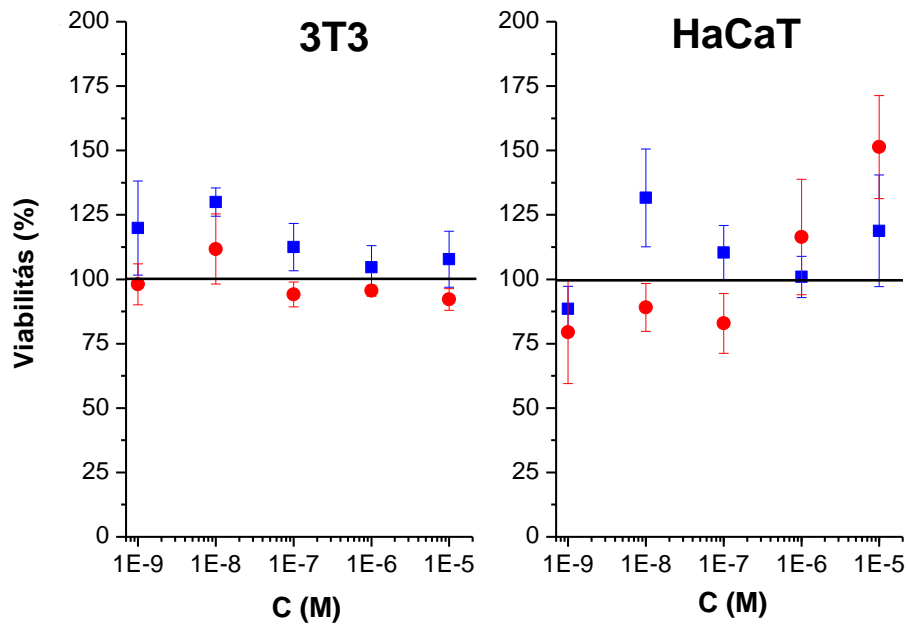
F3. ábra: A falloidin hatása a 3T3 fibroblasztok és a HaCaT keratinociták viabilitására
MTT és *AlamarBlue* assay-vel vizsgálva



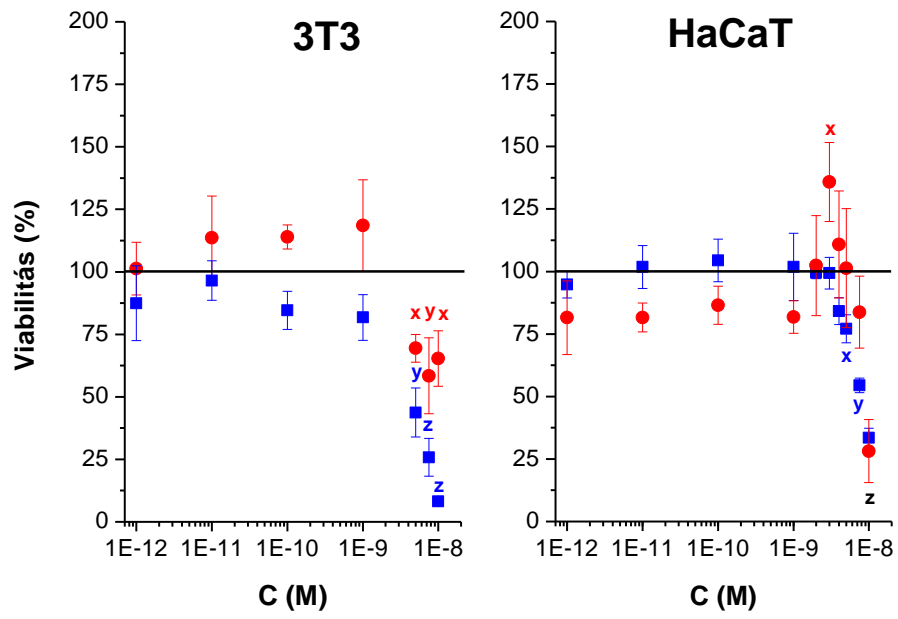
F4. ábra: A kolhicin hatása a 3T3 fibroblasztok és a HaCaT keratinociták viabilitására
MTT és *AlamarBlue* assay-vel vizsgálva



F5. ábra: A nokodazol hatása a 3T3 fibroblasztok és a HaCaT keratinociták viabilitására *MTT* és *AlamarBlue* assay-vel vizsgálva



F6. ábra: A blebbistatin hatása a 3T3 fibroblasztok és a HaCaT keratinociták viabilitására *MTT* és *AlamarBlue* assay-vel vizsgálva



F7. ábra: A kalikulin-A hatása a 3T3 fibroblasztok és a HaCaT keratinociták viabilitására *MTT* és *AlamarBlue* assay-vel vizsgálva