

# **A környezeti terhelések és patomechanizmusok kapcsolata**

*Ph.D. értekezés*

**Szerző:** Dr. Pálföldi Regina adjunktus

**Témavezető:** *Dr. habil. Gálfi Márta tanszékvezető főiskolai tanár*

SZTE JGYPK Környezet – Biológia és Környezeti Nevelési Tanszék

*Dr. habil. Somfay Attila tanszékvezető egyetemi tanár*

SZTE ÁOK Tüdőgyógyászati Tanszék

**SZTE TTIK Környezettudományi Doktori Iskola**

**2015**

**Szeged**

## Rövidítések

<b>ACTH</b>	Adrenocorticotropic Hormone
<b>Adh</b>	Adenohypophysis
<b>AET</b>	Acute esophageal toxicity
<b>ANOVA</b>	Analysis of Variance / Egyszempontos Varianciaanalízis
<b>ATP</b>	Adenosine-5'-Triphosphate
<b>BAX</b>	BCL2 associated X protein
<b>BCL2</b>	B-cell lymphoma 2 protein
<b>CIB</b>	Klórbenzolok
<b>COPD</b>	Chronic Obstructive Pulmonary Disease
<b>CT</b>	Computed Tomography
<b>ED</b>	Extensive Disease
<b>EDC</b>	Endocrine Disrupting Chemicals / Hormonháztartást Megzavaró Anyagok
<b>EHE</b>	Epitheloid Haemangioendothelioma
<b>EPM</b>	Elevated Plus Maze / Emelt keresztlabirintus teszt
<b>FCS</b>	Foetal Calf Serum
<b>GGT</b>	Gamma Glutamyl Transferase
<b>GTP</b>	Guanosine-5'-triphosphate
<b>HE</b>	Haematoxylin-eosin
<b>LD</b>	Limited Disease
<b>LDH</b>	Lactate Dehydrogenase
<b>MAPs</b>	Microtubule Associated Proteins
<b>MDR1</b>	Multi drug resistance 1
<b>MRI</b>	Magnetic Resonance Imaging
<b>NSCLC</b>	Non-small cell lung cancer
<b>OP</b>	Open-field/Nyitott mezős rendszer
<b>PEHE</b>	Pulmonary Epitheliod Haemangioendothelioma
<b>PET</b>	Positron Emission Tomography
<b>P-gp</b>	P-glycoprotein

<b>PIP</b>	Promethasine/Pipolphen
<b>POP</b>	Persistent Organic Pollutants / Perzisztens Szerves Szennyezőanyagok
<b>PRL</b>	Prolactin
<b>PRLoma</b>	Prolactinoma
<b>RI</b>	Resident-Intruder
<b>RIA</b>	Radioimmunoassay
<b>SEM</b>	The standard error of the mean
<b>SGOT</b>	Serum Glutamate Oxaloacetate Transaminase
<b>SGPT</b>	Serum Glutamate Pyruvate Transaminase
<b>TAX</b>	Paclitaxel/Taxol
<b>TX</b>	Taxane
<b>TXT</b>	Docetaxel/Taxotere

# Tartalom

<b>1. Bevezetés</b> .....	1
1.1. Viselkedési mintázatok és környezeti alkalmazkodási potenciál .....	2
1.1.1. Az agresszió .....	2
1.1.2. A szorongás (anxietás).....	3
1.2. A környezetterhelések és homeosztatikus válaszméchanizmusok.....	3
1.2.1. Környezeti terhelések és egyes kiváltott sejtfiziológiai válaszok .....	4
1.3. Környezeti alkalmazkodási potenciál csökkenés és egyes biológiai rendszerválaszok .....	7
1.3.1. Természetes szintetizátumok: taxánok és hatásaik .....	8
1.3.2. EDC vegyületek és egyes biológiai hatásaik .....	12
1.3.3. Fizikai környezetterhelések: elektromágneses sugárzások és a környezeti alkalmazkodási potenciál zavarok .....	13
1.3.3.1. Az ionizáló sugárzások és biológiai hatásaik .....	14
1.3.4. Környezeti hatások és sejt-transzformációs zavarok .....	14
1.3.5. Az élő rendszer belső környezeti eltérései.....	16
<b>2. Célkitűzés</b> .....	17
<b>3. Módszerek</b> .....	21
3.1. <i>In vivo</i> vizsgálatok.....	21
3.1.1. Kísérleti protokoll a klórbenzol kezelésekre hatását vizsgáló vizsgálatára.....	21
3.1.1.1. Viselkedés vizsgálatok .....	23
3.1.1.2. Open-field teszt .....	23
3.1.1.4. Viselkedési protokollok statisztikai analízise.....	24
3.1.2. Beteganyag gyulladás-követési protokoll .....	24
3.1.2.1. Statisztikai analízis.....	25
3.2. <i>In vitro</i> modellek .....	25
3.2.1. Sejt kultúrák vizsgálata, proliferációs aktivitás követés.....	26
3.2.2. Hisztológiai vizsgálatok.....	27

3.3. Kémiai és fizikai expozítorok .....	27
3.4. Ionmilieu változás vizsgálata .....	28
3.4.1. PRL és ACTH hormon meghatározások .....	29
3.4.2. Statisztikai analízis.....	29
3.4.3. Immuncitológiai vizsgálatok.....	29
3.5. Hiponatrémia prediktív jellegének vizsgálata betegcsoporton.....	29
3.5.1. Na <sup>+</sup> szint meghatározás szérumból .....	29
<b>4. Eredmények .....</b>	<b>30</b>
4.1. Expozítor vizsgálatok modellezése.....	30
4.2. <i>In vitro</i> vizsgálati modellek standardizálása .....	31
4.3. <i>In vivo</i> vizsgálati protokollok kialakítása és standardizálása .....	33
4.4. A CIB expozíciók hatása a viselkedés-elemekre .....	33
4.5. Krónikus fizikai expozíciók hatásainak vizsgálata.....	37
4. 6. Környezeti expozíciók és fiziológiai markerek kapcsolatának vizsgálata .....	38
4.7. Dinamikus, terápia-támogató eljárás kidolgozása PEHE kapcsán .....	40
4.8. Lokális környezeti feltételváltozások hatása a tumorok viselkedésére .....	43
<b>5. Megbeszélés.....</b>	<b>49</b>
<b>6. Köszönetnyilvánítás .....</b>	<b>57</b>
<b>7. Irodalomjegyzék.....</b>	<b>58</b>
<b>8. Összefoglalás .....</b>	<b>70</b>

# 1. Bevezetés

A homeosztázis az élő rendszerek olyan egyensúlyi komplexitásának állapota, amely biztosítja, hogy az adott biológiai rendszer életjelenségeinek fenntartása folyamatosan és hatékonyabb optimalizáltság mellett valósuljon meg. Az élő rendszerek a belső környezetük állandóságának biztosítására folyamathálózatokkal leírható alkalmazkodási mintázatokat alakítanak ki, így mint optimalizáló rendszerek a folyamatosan változó külső környezethez való alkalmazkodást új, a körülményeknek megfelelő egyensúlyi állapottal hozzák létre. A homeosztázis tehát egy olyan, kizárólag az élő anyagformákra jellemző belső egyensúlyi komplexitás, amelyben az adott egyensúlyt tartó biológiai rendszer, különböző dinamikus rendszerállapotaival alkalmazkodik a környezethez. Ezt, mint az esszenciális feltételhez való alkalmazkodási mintázatok sokaságát környezeti potenciálként értelmezhetjük [1, 2].

Az élő rendszerek külső környezete anyag és energiaforrásként, determinált iteráló háttérként van jelen, ugyanis ezen, és csakis ezen értelmezett az illető rendszer egyensúlya. Ha a környezet fizikai és/vagy kémiai és/vagy biológiai háttérelmei változnak, akkor azok az illető biológiai rendszert (organizmust) újabb és újabb iteráló folyamatok aktiválására (pl. magatartás-, hőregulációs változtatás) kényszerítik. Igen jelentős folyamatirányító tényező a környezet és rendszer kapcsolatának viszonylatában, az egyes iteráló folyamatrendszerek kiváltásának küszöbérték szerinti bekapcsolása. Mindez az élő rendszerek és környezetük kapcsolatának bináris kód szerinti működését igazolja. Ebben a kontextusban a binaritás az adott rendszer aktív (bekapcsolt) és inaktív állapotát jelenti. A belső környezeti egyensúlyok tartásánál is ugyanilyen küszöb szerinti aktiválási állapotot írtak le. Így amikor egy biológiai rendszer (biokémiai ciklus, sejt, szervrendszer, irányítási rendszer stb.) vizsgálatát tervezzük és végezzük, a modellezhetőség kritériumaként kell kezelnünk az előbb felsoroltakat [3, 4].

Az antropogén jellegű környezeti feltételek permanens és karakterisztikus változásai expozíció függően generálnak biológiai rendszerváltozásokat. Mindezekre leginkább az alkalmazott tudományterületek szakirodalmában találunk citálható irodalmakat, melyek pl. növény-, állat- és a humán orvoslás területeit képviselik. Belátható, hogy a gyógyászathoz kötött megfigyelések, majd ezek tudományos igényvel interpretált ismeretei hatalmas adatbázist jelentenek a környezettudomány számára. Az emberi élettartam alatt, a biológiai rendszerállapotok egyensúlya (azaz az egészséges kontroll) és az attól eltérő állapot (a módosult működésektől a manifesztálódott betegség) észleléséig a kórelőzménnyel ellátott és a betegség lefolyását kísérő objektív méréseken alapuló kórismereti folyamatok megfeleltethetők a rendszer és feltétel módosulásait jellemző eredményeknek.

A fizikai (elektromágneses sugárzások, ionizáló sugárzások) és/vagy kémiai (endokrin diszruptor környezeti ágensek /EDC/ vagy pl. az ezek modellezésére alkalmas taxánok /TX/, klórbenzolok /CIB/ stb.) környezetterhelések már szubtoxikus dózisban is megváltozott környezeti potenciált generálhatnak (pl. gyulladásoz megbetegedések, majd daganatok kialakulását is okozhatják) [5, 6, 7].

### **1.1. Viselkedési mintázatok és környezeti alkalmazkodási potenciál**

A környezetben zajló folyamatok a homeosztatisz rendszereket válaszreakció láncolatok kialakítására kényszerítik, amelyek közül az első jól identifikálható forma az egyed szintű komplexitás függvényében a viselkedésmintázatok módosulása és/vagy megváltozása. Ebben a kontextusban a viselkedési mintázatok is döntő elemei a környezeti potenciálnak. A viselkedés, magatartás az élő rendszerek homeosztatisz folyamatainak fajra és egyedre jellemző fiziológiai következménye, amikor is az illető biológiai rendszermintázat (pl. eltérő testhelyzetek, mozdulatok stb.) módosulásait a környezet (külső és/vagy belső) indukálja. Ezek a környezeti változások lehetnek a különféle (pl. fizikai, kémiai, biológiai) stresszhatások, amelyekre az élő rendszer a specifikitásának megfelelő viselkedési mintázat megváltoztatásával reagál. A homeosztatisz viselkedés által szabályozott folyamat lehet pl. az ösztönös és/vagy tanult feed-forward (előreccatolásos) válaszmechanizmus [8, 9]. Ilyen például a menekülés, amely egy mozgásállapot változással jellemezhető kiváltott válaszmechanizmus, és a homeosztázis fenntartására irányul. Különös jelentőségű viselkedés mintázatokat képviselnek továbbá a szaporodáshoz kötött magatartásformák. Az adott fajra, egyedre jellemzően fejeződnék ki a külső és belső fizikai, ösztönös és/vagy tanult viselkedési mintázatok, amelyben az aktivitás, vagy annak hiánya, a szorongás, a félelem, a vágy, a hajlamok, az emóciók, a társegyedekhez való viszonyulás (minősége): az agresszivitás és a dominancia is determinált [10].

#### **1.1.1. Az agresszió**

Az élőlények egészséges állapotban és környezetben állandóan versengenek a forrásokért, amelyek az életfeltételeik alapjait képezik (táplálék, terület, búvóhely, stb.). Az előnyösebb tulajdonságokkal bíró egyedek ebben a kompetícióban a forrásokhoz optimalizáltan juthatnak, ami kedvez a szaporodásuknak, és az egyedszámuk emelkedését okozhatja. Ennek megfelelően a versengésben olyan komplex lehetséges mintázatok jelenhetnek meg, mint az agresszió, mely olyan magatartást képvisel, amelyben pl. az egy fajhoz tartozó egyedek is kiszoríthatják egymást a forrásokból. Agresszió során olyan, az emlősök esetén ismert túlélési stratégiát megvalósító magatartásról beszélünk, amely arra irányul, hogy a másik egyedet

eltávolítsa az adott forrástól [11, 12, 13]. Az emberi magatartások során is tapasztalunk agressziót, melyeket két csoportba sorolunk:

- impulzív (reaktív, ellenséges, affektív),
- kontrollált (proaktív, instrumentális, ragadozó) agresszió [14].

Az állatvilágban észlelhető offenzív magatartáselemekkel azonosítjuk az impulzív agressziót, amikor is két felnőtt állat harcol az erőforrások védelmében (pl. az élelem, territórium, a nőstények stb.) [7]. Az állatoknál leírt defenzív viselkedés-mintázat párhuzamba állítható a humán kontrollált agresszióval. Az állatoknál ilyen magatartás akkor észlelhető, amikor egy állatot a fajtársa vagy egy ellenséges ragadozó támad meg [15, 16].

### **1.1.2. A szorongás (anxietás)**

Szorongásról beszélünk, amikor a félelem, a kellemetlen és rossz előérzet hatja át a viselkedést, jellemzi az érzelmi állapotot (pl. döntésképtelenségtől, bizonytalan jövőtől való félelem).

Ennek megjelenésekor az egyedet valamilyen valós vagy vélt veszély, fenyegetés éri, akkor olyan élettani válasz indukálódik az adott problémára irányuló pszichoszomatikus koncentráció során, amelyben a fiziológiai funkciók ugyan felkészülnek a megfelelő válaszméchanizmusra, de ezalatt az „agy” a lehetséges menekülőutakat és veszélyforrásokat elemzi. A szorongás egy komplex hangulati mintázat az azt jellemző folyamatos félelemérzéssel, vagy félelmetesnek vélt fenyegető dolgokkal szemben. Ezek kiegészülnek a negatív közérzettel és a biztonságot nyújtó objektumok (pl. búvóhely, csoport) keresésével. Környezeti stresszre adott fenyegető helyzetekben megfigyelhető szorongás normális válaszméchanizmus, hiszen a természetes szorongás elengedhetetlen az egyed környezeti kihívásoknak való megfeleléséhez. Ugyanakkor a túlzott mértékű szorongás már kóros az egyedre, amit humán vonatkozásokban pszichiátriai kórképek is igazolnak (pl. pánikbetegségek, fóbiák, poszttraumás stressz okozta betegségek, depresszió, és a pszichoszomatikus betegségek) [17, 18, 19, 20, 21].

### **1.2. A környezetterhelések és homeosztatisz válaszmechanizmusok**

A környezeti alkalmazkodási potenciál a biológiai rendszerek számára egy olyan komplex, térben, időben és egyéb dimenziókban karakterizálható válaszméchanizmus rendszer, amellyel az adott élő organizmus, a leginkább alkalmas iterációs megoldással alakítja életfolyamatait az adott feltételek (környezet) mellett. A már vázolt viselkedés mintázatok megjelenítése mellett, minden élő számos jól szervezett élettani folyamattal alkalmazkodik a környezeti feltételek (fizikai, kémiai és biológiai) változásaihoz. A környezetterhelések valós



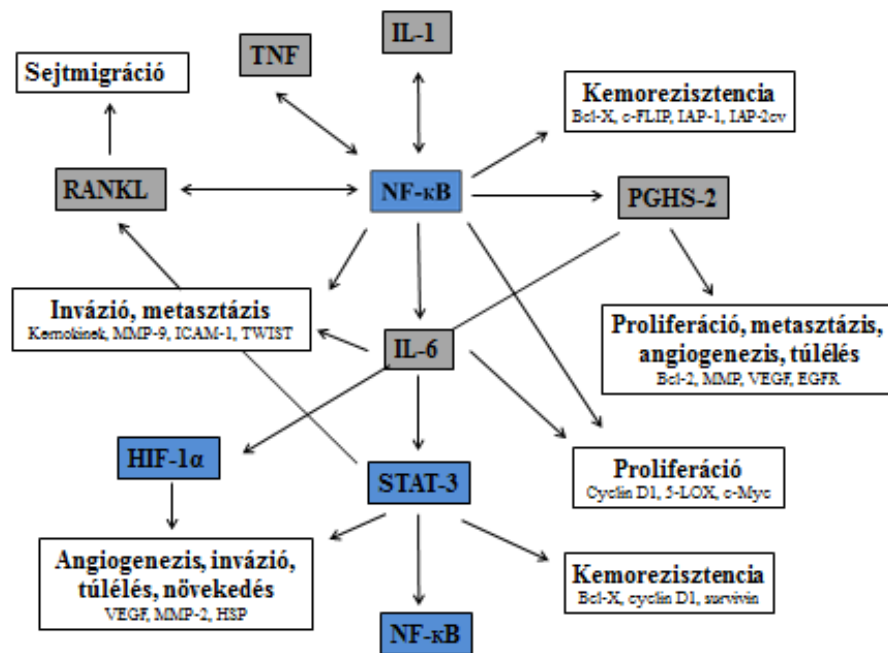
jellege a már említettek szerint az emberi társadalmakhoz kötött. Ezért igen fontos az ember által megváltoztatott környezet, azaz feltétel, és az arra választ generáló biológiai rendszer kutatása, megismerése.

Az állatvilág és az ember szociális viselkedését (pl. agresszió, anxietás) a környezeti terhelésekkel (kemikáliák, sugárzások) kiváltott magatartásmintázatok változásai az egészséges, homeosztatisz egyensúlyi tartományból a társas szinten nem jól alkalmazkodó, azaz negatív irányba terelhetik. Ennek következményeként a belső egyensúly fenntartásához igényelt források megszerzése, felhasználása akadályozottá válhat, ami a fiziológiai válaszmechanizmusok eltolódását okozza. Mindezek pl. állat- vagy humán gyógyászatban a fixálódó negatív fiziológiai események kapcsán betegségekhez vezethetnek. A vázolt generális betegségek sejtszinten is detektálható eltérésekkel jellemezhetők [22, 23, 24].

### **1.2.1. Környezeti terhelések és egyes kiváltott sejtfiziológiai válaszok**

A környezeti feltételek a sejtek egészséges fiziológiai- és sejtciklus működésében, így az alkalmazkodási mintázatok kialakításában, fenntartásában esszenciálisak. Ezen folyamatrendszerek környezeti terhelésre gyulladáson és transzformáción (sejtszaporulatot jelentő) patomechanizmusokká alakulhatnak.

A gyulladások során felszabaduló különböző mediátorok küszöbérték feletti (dózis) jelenlétükkel kaszkád eseményeket (pl. metasztázis képződés) generálhatnak, krónikus jelenlét után progrediáló folyamatok (pl. sejtttranszformációk) alakulhatnak ki (1. ábra) [25].

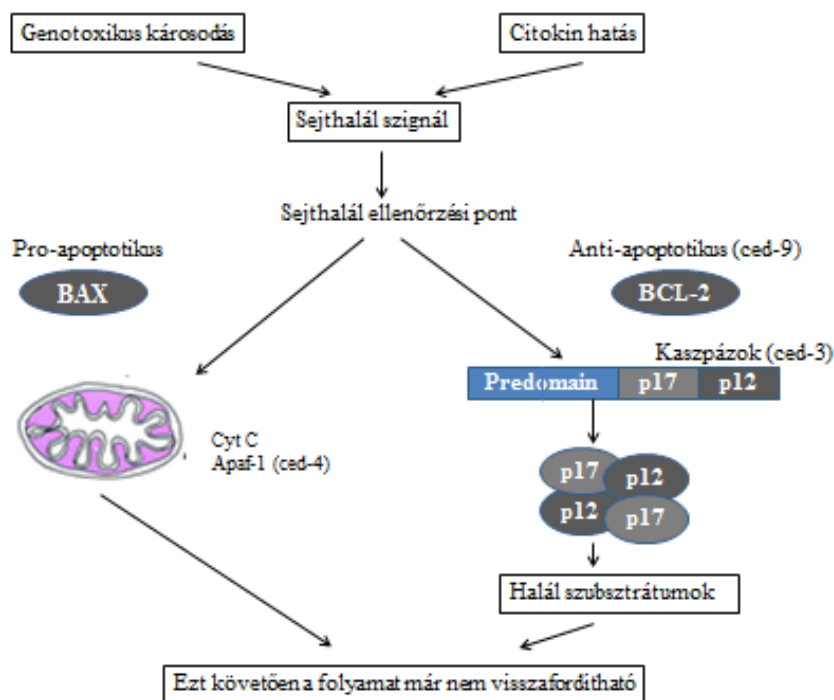


1. ábra. Gyulladásos folyamatkaszád [25]

(*IL-1: interleukin 1, IL-6: interleukin 6, TNF: tumornecrosis factor, RANKL: receptor activator nuclear factor kappa-B ligand, HIF-1 $\alpha$ : hypoxia inducing factor-1 $\alpha$ , STAT-3: signal transducers és activators of transcription 3, NF-KB: nuclear factor KB, PGHS-2: prostaglandin G/H synthase-2, MMP: matrix-metalloprotease, ICAM: intracellular adhesion molecule, TWIST:twist related protein, VEGF: vascular endothelial growth factor, EGFR: epidermal growth factor receptor, HSP: heat shock protein, 5-LOX: 5-lipoxygenase*)

A vázolt folyamatsorozatok tehát daganatok kialakulásához és progressziójához vezethetnek. Mindezeket megelőzően már tapasztalhatók eltérések (pl. a viselkedésmintázatok változásai is ilyen hatáskövetkezmények lehetnek). Lehetséges, hogy akut és alacsony dózisú környezeti expozíciók után még nem detektálhatók szignifikáns magatartásváltozások, de trend eltérések igen [22, 26]. A krónikus expozíciók, melyek kis változásokat kiváltó hatásokat jelentenek, már fiziológiai diszfunkciókat is okozhatnak (pl. a humán gyógyászat számos irodalmat közöl [27] gyulladásos betegségek kialakulására gastro-intesztinális, légzési szervrendszerben). Ezek követésére marker lehet egy krónikus kémiai expozíció következtében a citofiziológiai állapotokat prezentáló sejtvitalitást jelző BCL2 [28] intracelluláris protein jelenléte. Ismeretes, hogy a Bcl2 (B-cell lymphoma 2) gén terméke a programozott sejthalál (2. ábra) gátlásával is fenntartja a sejtek vitalitási egyensúlyát, amely folyamatkaszádban a sejtek életben maradását az aktív intracelluláris faktorok biztosítják (pl. a mitokondrium integritásának

megőrzésével, a normális membrán potenciál fenntartásával, a megfelelő citokin és egyéb kommunikációval /pl. proapoptotikus citokróm-c kiáramlás/) [28].

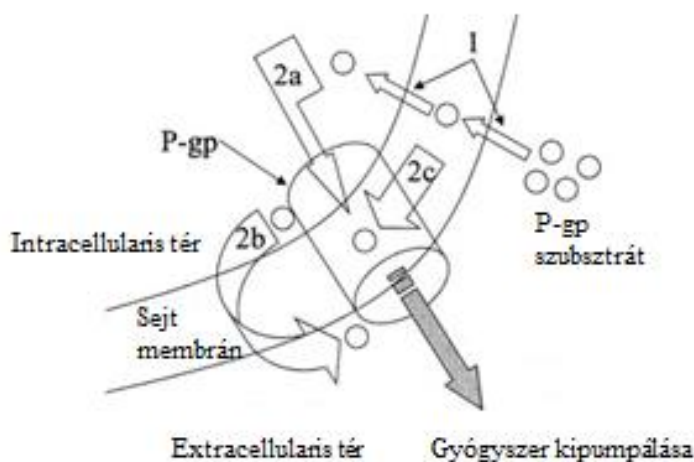


**2. ábra. Egyes apoptotikus folyamatok [28]**

(*ced*: caspase encoding, *Apaf-1*: apoptotic protease activating factor, *Cyt C*: cytochrome-c)

Amennyiben a sejtek homeosztatisz rendszerük fenntartása során a BAX/BCL2 (BAX: BCL2 associated X protein) egyensúlyi heterodimerekkel is jellemzett termékeiket egyes folyamatrendszer zavarok okán nem tudják biztosítani, úgy a szamuráj elv szerint fognak működni, miszerint a sejt inkább elpusztul (apoptotizál), mint rosszul működjön. Tehát a BAX proteinek túlsúlyával bekövetkezik az egyensúlytartásra képtelen („beteg”) sejt halála. Amikor pl. apoptózist indukáló szereket (toxikus ágenseket) alkalmaznak (pl. a természetben előforduló taxánok), akkor ezekkel szemben homeosztatisz védelmi reakcióként a sejt neutralizáló folyamatokat gerjeszt, mellyel eliminálja az illető ágenszt. Mindezt enzimatikusan és/vagy fizikai úton: a sejtől történő kipumpálással hajtja végre. Ez utóbbi esetén egy olyan pumpa mechanizmust (MDR: multi drug resistance) alakít ki a sejt, amellyel sokféle, a sejt számára káros anyagot (pl. toxinokat, gyógyszereket) képes eltávolítani. Ez a mechanizmus egy olyan efflux (kipumpálás), amelyért a P-gp (P-glycoprotein) /ATP-kötő fehérje/ felelős, amely az MDR1 (multidrug resistance-1 (MDR1=ABCB1)) gén terméke. A P-gp konstitutíve jelen van a bélfal hámsejtjeiben, a májban, a vesében és az agyi kapillárisok endotél sejtjeinek luminális membránjában. A sejtek efflux pumpája a különböző káros exogén (pl. lipofil vagy amfifil) anyagok elleni védekezési mechanizmusok egyike. Az orvosi gyakorlatban az efflux

pumpa nem kívánt hatásait az MDR-gén overexpressziója képviseli, mely farmakokinetikai szempontból jelentős [29] hatóanyag koncentráció csökkenést okoz (3. ábra). A multi drog rezisztencia bizonyos ágensekkel módosítható sejtfiziológiai folyamat, mely a nemzetközi kutatások fókuszában áll napjainkban is [30, 31].



**3. ábra. P-gp feltételezett kifelé irányuló működési mechanizmusa [29]**

(1) Passzív gyógyszer felvétel a membránon keresztül. (2a) Hidrofób csatornák (pórusok) keletkezése az intra- és az extracelluláris tér között. (2b) Flipáz aktivitás: a gyógyszer „átugrik” a membrán külső felszínéről a belső felszínére. (2c) "Vacuum cleaner model" amelyben a gyógyszermolekulák kapcsolatba kerülnek a membrán lipid részén belül a P-gp-vel, majd ezt követően azonnal visszakerülnek az extracelluláris térbe [29]

### **1.3. Környezeti alkalmazkodási potenciál csökkenés és egyes biológiai rendszerválaszok**

Környezeti terheléseknek a társadalmi tevékenységek során megjelenő fizikai, kémiai és biológiai expozíciókat tekintjük. A környezeti terhelések a földi viszonyok mellett háttér, azaz feltétel-módosító hatást képviselnek. A biológiai evolúció - a Föld totális evolúciós rendszerébe illesztett evolúciós alrendszer - a feltételek (értelmezési tartomány) által meghatározott aktív életfolyamatokkal (biológiai algoritmusokkal) jellemzett biológiai anyagmintázatok sokaságával alkalmazkodik.

Az alkalmazkodás egyik sejtszintű mechanizmusrendszere a sejtciklus módosulás, amely fixálódó biológiai rendszerzavarokhoz, nevezetesen daganatos betegségek kialakulásához vezethet [32, 33].

Mivel a környezeti alkalmazkodási potenciál vesztese az egyre magasabbá váló átlagos emberi élettartam miatt fokozódik (pl. genomiális módosulások), ez a következményes sejtciklus módosulások okán daganatok kialakulásának kedvezhet [34, 35]. A biológiai rendszer rendszeralgoritmusai is megváltoznak az élettartam emelkedésével, amelyek az

ismert gerontológiai események feltárásával kerültek igazolásra. Így a környezetterhelésekkel megváltoztatott feltételen egy már módosult (lelassult, és alacsonyabb komplexitási kapacitású) működést prezentáló rendszernek kell a homeosztatis egyensúlyt fenntartani [36, 37]. Az, hogy a daganatos betegségek incidenciája és prevalenciája idősebb korban igazoltan kifejezettebb, a vázolt okokkal is magyarázható [34].

A biológiai rendszer és/vagy környezeti feltételeinek megváltozása kapcsán értelmezett környezeti alkalmazkodási potenciál vesztésének eredményeként kialakult daganatok kezelése jelenleg a daganatsejtek elpusztítására fókuszál (sebészet, sugárkezelés, kemoterápia). Viszont a kialakulás okát képviselő esetleges környezeti tényezőket nem veszi figyelembe. A daganatok, melyek valójában a sejtttranszformációs zavarok sejtfiziológiai csoportjába sorolt elváltozások, óriási társadalmi problémát jelentenek. Ebben a kontextusban különösen fontossá vált a közvetlen expozíciós úttal érintett tüdődaganatok gyakoriságának növekedése miatti kutatások szélesítése. Hazánkban ezek a betegségek a magas morbiditású és mortalitású kórképek közé tartoznak.

A kiváltó (expozíciós) okok tekintetében nagy jelentőségűek mindazok, amelyek a belső homeosztatis egyensúly zavarának kialakításán keresztül is (krónikus expozíciók) képesek sejtttranszformációs diszfunkciókat előidézni. Ilyen hatásokat képviselnek a sejt-toxikus, valamint az EDC vegyületek, melyek környezetünkben természetes (pl. taxánok) és szintetikus (pl. klórbenzolok) formában vannak jelen, és erősen befolyásolják szervezetünk homeosztatis állapotát.

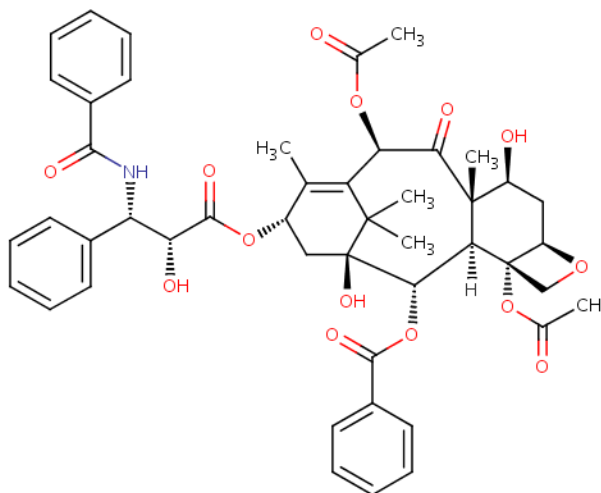
A már kialakult (pl. tüdőt érintő) sejtttranszformációs diszfunkció visszaszorítására különféle ágenseket és/vagy fizikai hatásokat alkalmaz az orvostudomány.

### **1.3.1. Természetes szintetizátumok: taxánok és hatásaik**

Természetes sejtciklust módosító hatóanyagok lehetnek környezetünkben a növények által szintetizált anyagok, amelyek biológiai és/vagy kémiai környezetterhelő jelentőségű anyagokká is válhatnak, amennyiben társadalmi tevékenységekhez kapcsolható jelenlétük. Nagy jelentőségű környezetkutatási szempontból az a tény, hogy a nevezett természetes anyagok alkalmasak a környezetterhelési folyamatok modellezésére. Ezek egy részéről ismert, hogy hatékonyan képesek gátolni pl. a sejttproliferációt, ezáltal daganatellenes hatással is bírnak. Ilyen anyag pl. a *Taxus brevifolia* által szintetizált, annak kérgéből extrakcióval nyert, majd tisztított kivonat (a taxán), melyről igazolt a citotoxikus hatás [38].

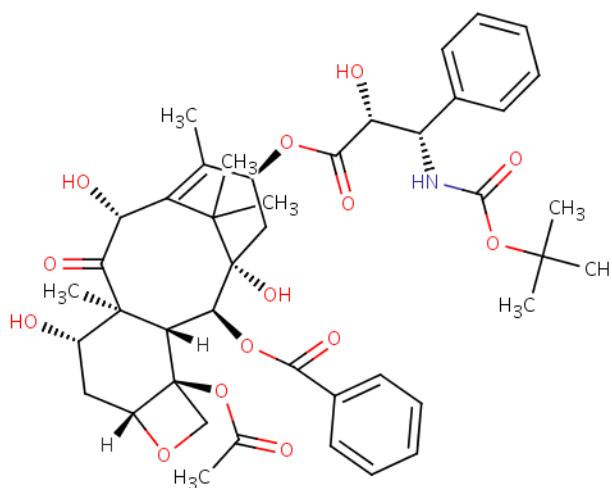
## Taxánok kémiaja

Gyógyszerkémiai szempontból igen jelentős vegyületcsoportról van szó. Az erősen lipofil paclitaxel (NSC-125973, védett név: Taxol; 4. ábra) tapasztalati képlete  $C_{47}H_{51}NO_{14}$ , molekulatömege 853,9Da.



4. ábra. Taxol (paclitaxel: TAX) szerkezeti képlete [39]

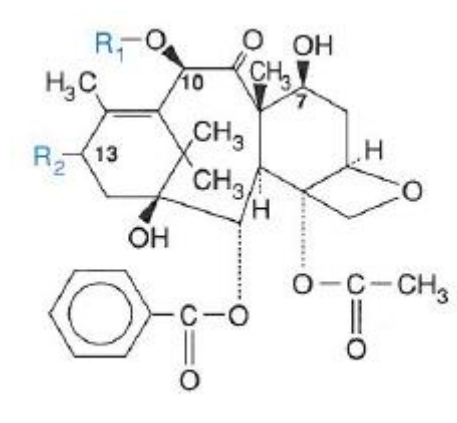
A lipofil docetaxel (NSC-628503, védett név: Taxotere), tapasztalati képlete (5. ábra)  $C_{43}H_{53}NO_{14}$ , molekulatömege 807,9 Da.



5. ábra. A docetaxel (TXT) képlete [40]

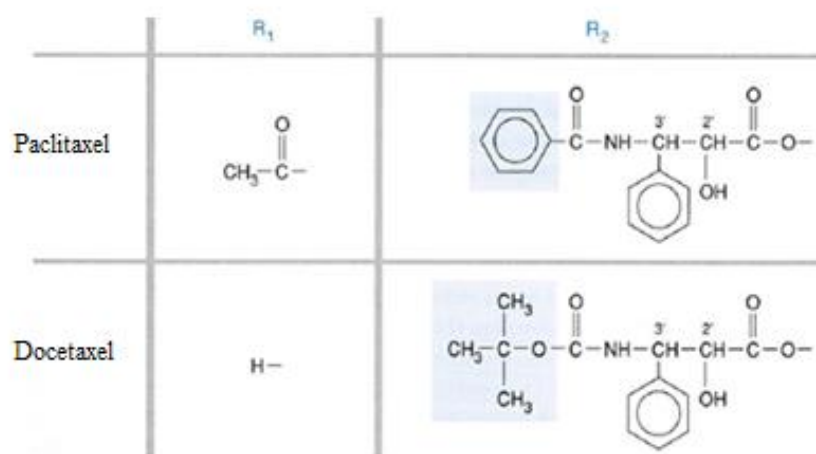
A taxol bonyolult diterpenoid, egy taxán-gyűrűt tartalmaz, amelyben egy négytagú oxetán gyűrű található. A 13-as pozícióban észterkötéssel kapcsolódik egy, a citotoxikus hatáshoz szükséges oldallánc. A paclitaxel és a docetaxel közötti strukturális különbségek egyike ebben az oldalláncban található: a paclitaxel fenil gyökét a docetaxelben terc-butiloxicsoprot helyettesíti. A másik különbség: a paclitaxelben a 10-es szénatomján az oxigénhez acetilsoprot, a docetaxelben pedig csak egy proton kapcsolódik (6. ábra A, B).

A vázolt kémiai eltérések okán kötődik a tubulinhoz a docetaxel 1,9-szer nagyobb affinitással, mint a paclitaxel. A baccatin-III a 13-as pozícióban (a citotoxikus hatáshoz szükséges oldallánc helyén) csak egy hidroxilcsoportot tartalmaz; ennek a 10-dezacetil származéka bőségesen nyerhető a *Taxus baccata* megújuló tűleveleiből.



A.

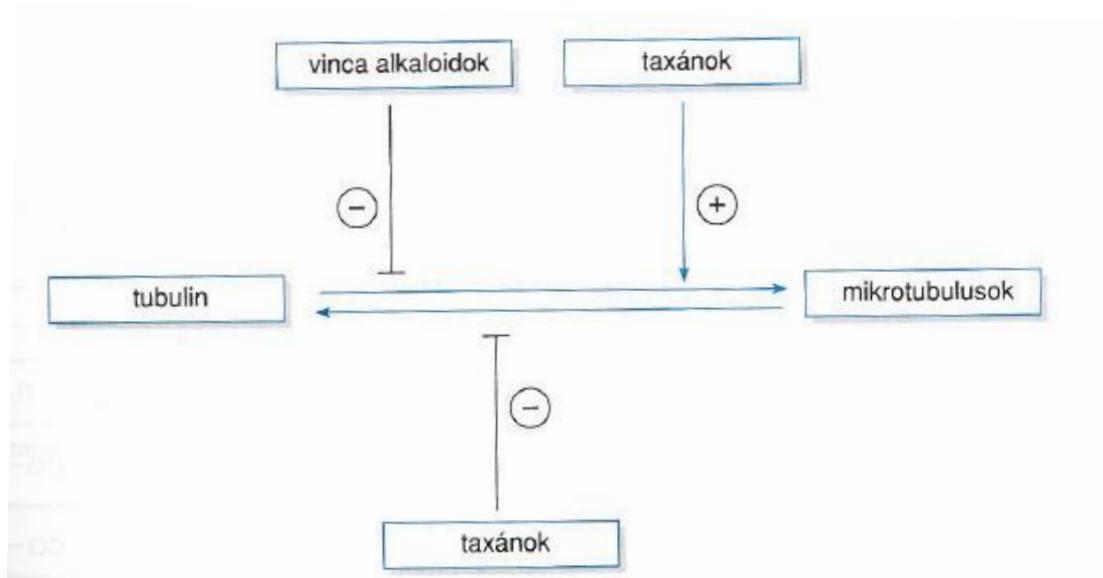
6. ábra. A: a taxánok szerkezeti képlete [38]



B.

6. ábra. B: a taxánok funkciós csoportjai [38]

A taxán a mikrotubulusok funkciójának gátlásán keresztül, azok stabilizálásával hat (7. ábra) [38]. A taxán az osztódási orsó mikrotubulusaihoz kötődik és akadályozza a tubulinegységek elvesztését, és ezzel stabilizálja a mikrotubulust, mely nem rövidül meg. Fiziológiás közegben a mikrotubulusok csak guanosine-5'-triphosphate (GTP) és bizonyos fehérjék (Microtubule Associated Proteins/MAPs/) jelenlétében alakulnak ki.



**7. ábra. A mitotikus orsóra ható gyógyszerek hatásmódja [38]**

A tubulinhoz kötődő és ezzel a mitotikus orsót gátló gyógyszerek közé viszonylag nagy molekulatömegű növényi eredetű anyagok tartoznak. Míg a vinca-alkaloidák gátolják a tubulin polimerizációját, és ezzel a mikrotubulusok képződését, addig a taxán származékok a mikrotubulus-képződés elősegítésével és stabilizálásával gátolják a mitotikus orsó funkcióját [38].

Ismert az is, hogy a mikrotubulusok hideg vagy  $\text{CaCl}_2$  hatására depolimerizálódnak, amit a paclitaxel gátol. A paclitaxel csak polimerizált tubulinhoz kötődik, a kötődés adenosin-5'-triphosphate (ATP) hiányában is végbemegy, viszont a mikrotubulus kötegek ezt követő kialakulása már energiaigényes folyamat. A taxán kötődési helye a  $\beta$ -tubulin N terminális 31. aminosava. A mitotikus orsógátlás sejtszintű következménye, hogy a  $G_2$ -M fázisban megállítja a proliferáló sejteket, azaz sztatizálja. A taxánok a mitotikus blokádnak előidézéséhez a szükségesnél alacsonyabb koncentrációban befolyásolják a sejtek motilitását és ez összefügghet az angiogenezist (érképződést) gátló hatásukkal is [41, 42].

A taxánok tehát olyan természetes környezeti ágensek, amelyek generális sejthatásaik mellett egyértelműen a sejtciklus szabályozását változtatják meg, ezzel alakítva át a biológiai rendszer környezeti alkalmazkodási potenciálját.

A taxánokkal szembeni rezisztencia viszont már a sejtek védelmi mechanizmusát képviselő homeosztatiszikus folyamatkaszád eredménye, amely a célmolekula eltávolítására irányul.



Neutralizálással a tubulin-izofomák expresszáldási aránya vagy a tubulin poszttranszlációs módosítása változik meg. A tubulin szerkezetét érintő mutációk is rezisztencia kialakulásához vezetnek [43, 44, 45]. Jelentős rezisztencia típus még az MDR1 gén által kódolt P-gp fokozott expressziója következtében jelenik meg, ez a multidrog rezisztencia ismert formája, amely számos, eltérő kémiai szerkezetű, nagyobb molekulájú, természetes eredetű gyógyszerrel szembeni rezisztenciát jelent [46].

### **1.3.2. EDC vegyületek és egyes biológiai hatásaik**

A XX. század a kemizáció évszázadaként írta be magát a társadalmak történetébe. Sikerült számos olyan, a természet által korábban nem ismert kémiai anyagot szintetizálni (persistent organic pollutants /POP/), amelyek nagy perzisztenciával (fizikai-kémiai stabilitás) és bioakkumulációval (felhalmozódás a biológiai organizmusokban), és ebből adódóan széles biológiai hatásspektrummal (máj-, vese-, neurológiai, endokrinológiai, immunológiai stb. célhatás), valamint különböző toxicitási (mérgezési) sajátságokkal jellemezhetők [6, 47].

Kiemelt jelentőségű POP ágensek a halogénezett szénhidrogének, melyek között számos EDC hatású vegyületet ismerünk [48, 49]. Az EDC vegyületek a homeosztatisz rendszereket endokrinológiai támadásponttal érintik a hormon, és/vagy a cél-receptor és/vagy a differenciált endokrin-funkciójú sejtek működése tekintetében. Amikor már a regulációs szinten bekövetkező biológiai rendszer algoritmusainak változása miatt tolódik el a környezeti alkalmazkodási kapacitás, akkor igen erős rendszerzavarokat detektálhatunk a kiváltó EDC ágens dózis és hatásexpozíciójának függvényében. A klórbenzolok, mint POP, EDC vegyületek fungicidként kerültek először 1933-ban alkalmazásra [50]. Ismertek akut és/vagy krónikus expozícióikban okozott hatásaik, pl. porfiriás betegségek, a vörösvérsejtek membránmódosulásai, a sejt proliferációs és/vagy szignalizációs elváltozásai, genomiális zavarok, gyulladáshos elváltozások, tumorindukció, az immunrendszer modulációja, bőr és tüdőléziók megjelenése, csontanyagcsere és egyéb homeosztatisz zavarok [6, 51, 52, 53].

A ClB kémiai szerkezetük szerint monociklikus, klórozott aromás szénhidrogének. A monoszubsztituált származékok további elektrofil szubsztitúciós folyamatokban vehetnek részt, így egy újabb halogén atom a fennmaradó további szénatomokra kerülhet. Az ilyen vegyületek kialakulását nagymértékben determinálja a szubsztituensek irányító hatása, aktiváló és deaktiváló jellege, melyek a molekula reakciókészségét határozzák meg (pl. a Cl szubsztituens orto-para-irányító deaktiváló jellegű, mely a reakcióképesség fokozatos csökkenését eredményezi) [54].

A CIB-k az élő rendszerekre ható nagy előfordulási gyakoriságú vegyületek, amelyek alkalmasak a környezetterhelési modellekben expozítor szerep kialakítására [55, 56].

A CIB vegyületek dóziszfüggően apoptotikus tulajdonságúak és/vagy a belső környezet megváltoztatásával a homeosztatis funkciókat (neuro-endokrin, immun stb.) rontják. Hatásukra a belső környezet funkcionáló sejtjeinek ionmilió módosulásai is detektáltak [57, 58].

Ilyenkor valamilyen külső környezeti tényező (pl. EDC) közvetlen, vagy közvetett hatására krónikus gyulladások következnek be, majd megváltozik egyes sejtek sejtproliferációs aktivitása. Mindez kóros sejtproliferációs klónok kialakulásához vezethet, amelyek növekedése révén manifesztálódó tumorok alakulhatnak ki [59, 60] (pl. a normál sejtciklus megváltozása tüdőbetegségek alapja is lehet - intersticiális tüdőbetegségek, COPD, asthma bronchiale) [61, 62, 63].

### **1.3.3. Fizikai környezetterhelések: elektromágneses sugárzások és a környezeti alkalmazkodási potenciál zavarok**

Az evolúciót meghatározó fizikai energiaformák egyrészt környezetünk természetes, másrészt társadalmi tevékenységekből származhatnak (pl. elektromágneses sugárzások). A természetes elektromágneses háttér a Föld mágneses és elektromos teréből, a meghatározó földi természeti jelenségekből (pl. szelek, légköri elektromos jelenségek), a világútból, valamint a Naptól származó elektromágneses sugárzásokból tevődik össze. A Földnek közel állandó erősségű mágneses tere van, amely a Föld belső folyékony magjának és a Föld mozgásának hatására kialakuló öngerjesztő rendszernek tulajdonítható. A Föld elektromos terének nagysága is közel állandó (talajközeli levegőben a pozitív töltések aránya nagyobb, mint a negatív töltéseké) [64]. Ismertek még az elektromágneses terek termikus és nem termikus jellegű hatásai is.

Az elektromágneses erőterek molekuláris struktúra-változásokat az abszorbeálható energia-tartományukban fejthetnek ki (kémiai kötések hasításához szükséges energiák 2-5 eV közé esnek). Mivel a sejtek elektromos tulajdonságai funkcióik alapját képezik, így az általuk abszorbeált energia nagysága a belső térerősségtől, mágneses permeabilitástól, és az elektromos permittivitástól függ [65].

### ***1.3.3.1. Az ionizáló sugárzások és biológiai hatásai***

Természetes ionizáló sugárzások a Napból és az űrből származnak, de hatásukban nem azonosak a mesterséges radioaktivitással. A sugárbiológiában (továbbiakban) a sugárzás energiatartalma szerint elkülöníthetünk kis (1-6 eV), átmeneti ( $6-10^3$  eV) és nagy ( $10^4-10^9$  eV) energiatartományokat. Az élő rendszerek számára ártalmasnak főként a kis vagy a nagy energiájú tartomány bizonyul. A sugárzás az anyagban való haladása közben elnyelődik, sugárzást jelentő részecskék a pályájuk mentén ionokat hoznak létre. A biológiai anyagformában a sugárzás hatásait több tényező is befolyásolja, pl. az eltérő biológiai variabilitás. A sugárhatás dózissal jellemzett, ennek követése a humánorvoslásban a terápiás eljárásokhoz kötötten jól ismert és dokumentált. A sugarak hatásaira legérzékenyebbek a még nem differenciálódott, fiatal, gyorsan osztódó sejtek populációi. A hatást illetően direkt és indirekt, reverzibilis és irreverzibilis formákat különítünk el. Az ionizáló sugárzások genetikai hatásai rendkívül súlyos közvetlen és közvetett, általában irreverzibilis változást eredményeznek. Az örökítő anyagban bekövetkezett degradáció, mutáció gyakran öröklődhet, így generációs hatású is lehet - pl. a hibás gének enzimdefektusokhoz vezethetnek [66]. Ezért is előírtak törvényileg a megengedett maximális sugárdózisok (pl. a sugárzással dolgozó és nem dolgozók, életkor, szervek stb. szerint) [67]. Mivel az ionizáló sugárzások az osztódó sejteket dózis és behatás függően apoptotikus útra kényszerítik, így a terápiás gyakorlatból nagyon sok hiteles információval rendelkezünk a célzott és nem célzott sejteket, szöveteket érő hatásokról.

### **1.3.4. Környezeti hatások és sejt-transzformációs zavarok**

A környezet fizikai (sugárzások) és/vagy kémiai (EDC, POP) terhelései számos alkalmazkodási mintázatot juttatnak kifejezésre (expresszálnak) az élő anyagformákban, így az ember esetében is. Ezek természetesen kedvező és kedvezőtlen következményeket is képviselhetnek. Az orvostudomány csak a kedvezőtlen eseménysorozatokat követte, pl. a gyulladások és daganatok tekintetében igen komoly és hiteles adatbázissal rendelkezik. Mivel hazánk listavezető a rákhalálzási statisztikák terén az Európai Unióban (ezen belül a tüdőrák gyakorisága az utóbbi ötven évben megtízszereződött), így különös jelentősége lehet ebben a vonatkozásban az egyes újonnan megjelenő biológiai alkalmazkodási módzatok vizsgálatainak. Ezek lehetnek olyan sejtproliferációs problémakörök is, amelyek az új, ritka tumoros kórképek megjelenését érintik (pl. PEHE: pulmonary epitheloid haemangioendothelioma) [68, 69]. Az említett betegségcsoportok a napjainkban ismert statikus képalkotó diagnosztikákkal (CT, MRI, PET) nem karakterisztikusan differenciálhatók, még akkor sem, ha kiegészülnek a specifitásukat megadó hisztológiai

azonosításokkal is (immunhisztokémiai szövettani eredmények) [70, 71]. Fontos tény, hogy a PEHE kialakulási mintázata egy valós alkalmazkodási mintázat megjelenését prezentálhatja számunkra, az aktuális biológiai élő-anyagmintázat alkalmazkodási potenciáljának vesztésével vagy átalakulásával.

### ***Pulmonary Epitheloid Haemangioendothelioma***

Az epitheloid haemangioendothelioma (EHE) tüdőre lokalizált formája a PEHE. Igen ritka endothelialis tumor [72]. Először bronchio-alveolaris agresszív tumornak vélték [73], majd Corrin és munkatársai immunhisztokémiailag igazolták a tumor endotheliális eredetét [74]. A PEHE átmenet a haemangioma és az angiosarcoma között, intermedier malignitású [75]. Kezdetben tünetmentesen fejlődik a kórkép, majd köhögés, váladékürítés mellett radiológiailag detektálható, általában 2 cm-nél kisebb uni- vagy bilaterális multiplex nodulusok formájában [70, 71, 76]. Gyakran észlelhetők atípusos nodulusok, melyek az artériákban és a vénákban proliferáló daganatsejtek és kis vértések következtében alakulnak ki [70]. Szövettanilag egy angiocentrikus ér eredetű tumor (pozitív: CD 31, vimentin; CD34 és VIII. faktor antigén vesztés), sokszor detektálható kalcifikációval [70, 72, 75, 77].

Boudousquie és munkatársai kimutatták, hogy gyakran megfigyelhető a 7-22 kromoszóma reciprok transzlokációja, a 11 kromoszóma monoszómiája és Y kromoszómavesztés [78].

A diagnózis felállítása igen nehéz, amit érthetővé tesz a polietiológia - pl. többféle környezeti expozíció kiváltó hatásai, vagy a kialakulási stádiumok felismerési biztonsága. Jelen állásfoglalás alapján a PEHE egy multiplex megjelenésű tumor.

Jelenleg a betegség standard terápiája nem ismert [72]. Többféle citotoxikus ágens került már alkalmazásra kombinálva citokinekkal és hormonokkal [70, 72, 74, 79, 80, 81], és ismert érzéketlensége a sugárterápiára [79].

A PEHE megjósolhatatlan prognózisú, a felfedezéskor meglévő tünetek erősen prognosztikus jelentőségűek [70, 72, 76].

Mivel az adott PEHE kórképnek a környezeti alkalmazkodási potenciállal való követésének jelentősége a terápia szempontjából hasznos, így érdemes ennek olyan markereit megtalálni, és követni, amelyek nemcsak terápiás hatékonyságukban előnyösebbek, hanem az általános biológiai mechanizmus feltárásához is közelebb visznek. Amikor a környezeti alkalmazkodási potenciál vesztését tanulmányozzuk, akkor egy olyan élőrendszer algoritmus módosulását követjük, amely adott feltételen, ahhoz való alkalmazkodás komplexitásának csökkenését

mutatja be. Azok a jelek, amelyek egy alkalmazkodási mintázat követését lehetővé teszik egy adott pillanatban egy adott állapotot, mint egy fotó rögzítenek pl. a kóros elváltozás elhelyezkedését, méretét, sejt-specifitását. Ezen túlmenően az új működési rendszer mechanizmusairól, vagy annak esetleges viselkedéséről, továbbá epigenetikus vonatkozásokról, esetlegesen a későbbi rendszeralgorithmusok megvalósulási kockázatáról nem adnak felvilágosítást. Igen jelentős lehet tehát az adott diszfunkciós folyamatok viselkedését jellemző dinamikus adatok megismerése.

### **1.3.5. Az élő rendszer belső környezeti eltérései**

Környezeti alkalmazkodási potenciál vesztésével egyre nehezebb az eredeti aktív biológiai rendszerállapotok és az így kiváltott homeosztatisz folyamatok fenntartása. Az ontogenezis kezdetén a totipotens alkalmazkodási képességű rendszer egyre több, megváltozott fiziológiai algoritmussal rendelkezik, és egyre inkább új rendszeregyensúlyok felé halad. Ezek sok esetben a kiindulási állapothoz viszonyítva betegségeként értelmezhetők. A krónikus környezeti hatások eleinte nehezen rögzíthető eltéréseket okoznak, melyeket a rendszerbiológia kis zavarokként értelmez. Később, a permanens expozíció okán ezek a hatások egyre erősebb eltérésekkel jelzik a rendszer állapotváltozásait, pl. strukturális zavarok (daganatok) kialakulásával [82]. Fontos tény, hogy a megváltozott rendszernek nemcsak a külső környezetével kell egyensúlyt fenntartani, hanem a belső, pl. intracelluláris milieu-ben is. Kérdéses, hogy ennek a belső - a biológiai alrendszer (pl. sejt) szempontjából jelentős - környezetnek lehet-e olyan marker szerepe, amely a teljes biológiai rendszerben zajló állapotváltozások követésére alkalmassá teszi azt [83] pl. extracelluláris ionmilieu, mediátorok.

## 2. Célkitűzés

Az élő rendszerek egyensúlyának komplex módon való fenntartása a homeosztázis, amely egy jól karakterizálható feltételen, mint a rendszer értelmezési tartományán működik [84]. Az a biológiai algoritmus, amellyel az élő rendszer belső állandó iterálása mellett észlelhető rendszer-egyensúlya kialakul, a fenntartott belső környezet viszonylag szűk határok közötti egyensúlyi dinamizmusát követeli meg. Ebben a belső környezetben a szervrendszerek, szervek, szövetek, sejtek és sejt-közötti terek stb. képezik azokat a belső környezeti feltételeket, amelyek szervezetségi szintjükkel a teljes élő-rendszer egyensúlyának domináns szereplői. Amikor egy biológiai rendszer egyensúlya kerül vizsgálatra, követni kell, hogy milyen széles spektrumban és idődimenzióval képes az adott szervezet az alkalmazkodását prezentálni. Természetesen számos olyan dimenzió is szerepet játszik az aktuális alkalmazkodás megítélésében, amelyeket még nem ismerünk eléggé ahhoz, hogy be tudjuk vonni rendszeres vizsgálatainkba (pl. nano-, atto-dimenziók). A környezethez, mint feltételhez való rendszer-alkalmazkodás egy élő anyagmintázatban az adott rendszer alkalmazkodási potenciáljával jellemezhető, amely a komplex folyamatok élekciklusra jellemző strukturális mintázatának egyensúlyi mobilizálásával követhető [85]. Mindez a feltétel-változásokkal (azok minőségi és mennyiségi átalakulásával), valamint a rendszer változásával (öregedés; genomikai és/vagy proteomikai változások stb.) folyamatosan módosul [86].

Amikor ezek a módosulások küszöbérték felettié válnak [87, 88], a rendszer új biológiai algoritmusok kialakításával reagál, amelyek a rendszer létét annak megfelelően veszélyeztethetik, hogy azok a módosulások mennyire lesznek elszigeteltek. Ez a megalapozott rendszerdinamikai követési mód képviseli azt a kutatási stratégiát, amelybe illetően kívánjuk jelen Ph.D. dolgozat vizsgálati célterületeit elhelyezni. Ennek kapcsán az igazoltan egészséges állapotot és annak változásait (transzformált) kívánjuk követni a daganatok kialakulási eseménykaszádján keresztül olyan módon, hogy a lezajló folyamatok állapotváltozásaira (trajektória módosulásaira) találjunk jellemző markereket - a folyamat kezdeti és előrehaladását jelezve. Továbbá, hogy ezekhez illetően a feltétel, azaz a környezetállapotok változásait követni tudjuk, keresve az ok-okozati összefüggéseket a feltétel módosulás és rendszer-átalakulások között. Mindezeket egységesen a környezeti alkalmazkodási potenciálként kívánjuk asszociálni.

Jelen munkában a biológiai rendszervizsgálatok tanulmányozását úgy kívánjuk megvalósítani, hogy abban a környezeti potenciált determináló külső feltételek - fizikai és kémiai expozíciók változásai - mellett, azzal párhuzamosan a belső biológiai rendszer-algoritmusok genetikai és

proteomikai - egyes általunk megkeresett - jellemzőit is követjük. Kutatásainkat induktív és deduktív módon kívántuk annak szolgálatába állítani, hogy a környezeti hatások dinamikus változásai által gerjesztett folyamatok megismerésével az élő rendszerek környezeti potenciálmódosulásait nyomjelző markerek egyes tartományait és típusait megjelölhessük. Azzal a nem titkolt szándékkal kívántuk ezt tenni, hogy adatokat szolgáltatathassunk a majdani rendszerszintű beavatkozásokhoz, esetlegesen megtalálva a szerveződési szintekhez köthető küszöbhatásokat is.

### ***1. cél***

Először is a környezeti szempontból jelentős hatásokat kívántuk modellszinten értelmezni, majd ennek megfelelően biológiai jelentőségük szerint karakterizálni. Modell-rendszerben kémiai és fizikai expozíciós rendszert kívántunk felállítani annak a követelménynek megfelelően, hogy szintetizálhassuk a szakirodalomban megjelent, de más szakmai diszciplínában közölt hiteles eredményeket a környezettudomány területein belül. Ennek a célnak a megvalósításakor a kémiai expozíciók kapcsán természetes növényi termékek közül a taxánra (TX) és a xenobiotikus hatású CLB-re esett az igen gazdag szakirodalmi háttér (orvostudományi, gyógyszerésztudományi, kémia tudományi és biológiai publikációk [38, 41, 42, 50, 55, 56]) alapján a választás. A fizikai expozíciók kapcsán az elektromágneses sugárzások közül, szintén a nagy szakirodalmi [64, 66, 67] citálhatóság okán is, a mesterséges ionizáló sugárzások célzott szöveti, és nem célzott, azaz mellékhatásait kívántuk kutatni.

### ***2. cél***

Munkánk során az expozíció választás mellett az alkalmas kutatási és vizsgálati modellek kialakítása és standardizálása volt a következő megvalósítandó feladat. Ezért *in vivo* és *in vitro* modellekkel is követni kívántuk a különféle környezeti terhelések kiváltotta biológiai rendszert érő stresszhatások eredményeit.

A. *In vivo* állatkísérletes modellrendszer kidolgozása során a következő megvalósítandó célfeladatok kerültek kijelölésre:

1. - modellrendszer kialakítása,  
(viselkedés vizsgálatok bevezetése a megfelelő expozíciós utakkal)
2. - a modell standard működési körülményeinek jellemzése (nemzetközi standardok alkalmazásával)
3. - a rendszerválaszok statisztikai modellekre jellemző követésének biztosítása párhuzamos mintarendszerekkel és elemzési biztonság kialakításával.
  - a. kémiai terhelések toxikus és szubtoxikus dózisainak meghatározására.

B. *In vitro* kutatási modellek kialakítása az *in vivo* modellvizsgálatok 3. pontjának megfelelő logikai rendszerben a következő célfeladatokat képviselik:

- b. sejtszintű kémiai terhelésvizsgálatok modelljeinek beállítása, standardizálása (primer humán egészséges és transzformált, primer patkány egészséges és homeosztatis zavar generálással, valamint kémiai expozícióval kiváltott transzformált sejt-kultúrákon).
- c. sejt-dinamikai vizsgálatok sejtsztódás, sejt-differenciációs folyamatok követésére.

### C. Betegvizsgálatok

Humán vonatkozások relevanciája okán, valamint a környezettudományi diszciplináris spektrum szélesítése miatt, igen fontosnak véltük a beteganyagok tanulmányozását is.

1. Egészséges és daganatos betegek anamnézisének, valamint vizsgálati - protokolloknak (képalkotó, hisztológiai, biokémiai) követése.

2. Előkísérleti eredmények ismeretében további célzott folyamatkövetési vizsgálatok kialakítása a megfelelő markerek felderítésére (*in vitro* rendszerekből: primer sejt-kultúrákból, műtéti objektumokból és egyéb beavatkozások mintáiból).

#### **3. cél**

A fenti kutatási modellekkel végzett vizsgálatokban arra is kerestük a választ, hogy a különböző EDC hatású anyagok (CIB) /pszicho/-neuro-endokrin- rendszerre gyakorolt hatása során melyek lehetnek az első értékelhető rendszerválaszok.

Ezek - a viselkedésben bekövetkezett - rendszerválaszok értékelhető módon kimutathatók-e, és alapjai lehetnek-e a további környezeti potenciálvesztést jelző folyamatkaszád vizsgálatára?

#### **4. cél**

A viselkedési vizsgálatok alapján relevánsnak tekinthető krónikus expozíciók (*in vivo* szubtoxikus – kémiai és/vagy fizikai expozíciók) következtében esetlegesen kialakuló gyulladások és az ezek révén felszabaduló mediátorok a sejt-transzformációban is szerepet vállaló kommunikációs markerek lehetnek-e?

Továbbá milyen lehetséges genomialis markerek követése válhat így indokolttá, különös tekintettel a daganatok terápiájára, és egyéb, a biológiai rendszerek alkalmazkodási potenciálját fenntartó folyamatokra?



### **5. cél**

Jelen kutatási tématerülethez kapcsoltan a humán vonatkozások szakirodalmi háttére igen széles spektrumú felhasználható adatbázist jelent [68, 69, 70, 71]. Ennek segítségével, valamint saját kutatási protokollunk kialakításával kívántunk választ keresni arra a kérdésre, hogy miként lehetne a daganatok esetén a megfelelő terápia kiválasztását és/vagy a környezeti potenciál alakulásának változásait új, dinamikus módszerekkel követni.

### **6. cél**

A dinamikus módszerrel új terápia-megalapozó és farmakoterápiásan hatékonyabb kezelési protokoll kialakítását céloztuk meg. Ezzel az adott biológiai rendszer alkalmazkodási potenciáljának fenntartását meghatározó folyamatirányok megismerése is célunk volt.

Ebben egyrészt feladatunknak tekintettük, hogy a rendszert (az adott sejtattraktort) a meghatározó mediátorok segítségével próbáljuk sejtciklusának megfelelő homeosztaticus állapotába (pl. kiváltható apoptózis fenntartása) juttatni. Másrészt, hogy meghatározzuk azokat a feltétel (extracelluláris ionmilieu) elemeket, amelyek a rendszerműködést az említett homeosztaticus védelmi mechanizmus irányába képesek eltolni [89].

### 3. Módszerek

A célkitűzésben megfogalmazott problémakörök megválaszolásához *in vivo* és *in vitro* állatkísérletes kutatási protokollokat alakítottunk ki. Ezekből származó eredményeinket emberi vonatkozások tekintetében is extrapolálni kívántuk, ezért jelen munkánkba humán vizsgálatokat is bevontunk a megfelelő betegcsoportok (elsősorban tüdődaganatos betegek - pl. makroszkópos tüdőtumor, PEHE) ellátásához kötöttek. A humán betegcsoportok biopsziás szövetmintáiból *in vitro* vizsgálati rendszereket alakítottunk ki, amelyekből kísérleti protokollok szerinti vizsgálatokat végeztünk.

#### 3.1. *In vivo* vizsgálatok

##### 3.1.1. Kísérleti protokoll a klórbenzol kezelések hatásának vizsgálatára

*In vivo* kísérleteinkbe leletezett, Wistar (♂; ts.:180-350g) patkányokat (Charles River, Isaszeg, Magyarország) vontunk be. Kondicionálást követően [90] az állatokat standard műanyag ketrecben, kontrollált körülmények között: 22±2 °C-os hőmérséklet; 55-65%-os relatív páratartalom; 12 h sötét/12 h világos fényviszony periódus mellett tartottuk.

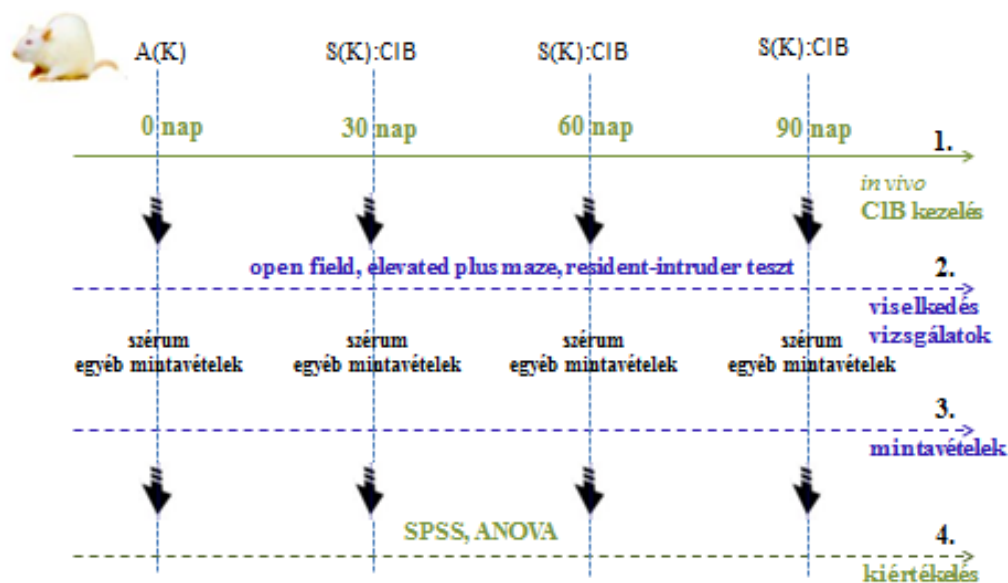
A kisebb, nem rokon, 150-200g súlyú, 4-6 hetes hím Wistar patkányok kezdetektől elkülönítve, másik helyiségben voltak a fent említettel azonos körülmények között. Ezeket a viselkedés vizsgálatokban betolakodó állatként alkalmaztuk. A laboratóriumi rágszáló eleség (CRLT/N, Charles River, 175 Gödöllő, Magyarország) és csapvíz igényük szerint elérhető volt. Az állatok gondozása és a vizsgálati eljárások szigorúan az Európai Közösség Tanácsának 86/609/EEC irányelvei szerint történtek.

A kísérleti állatok 1:1 arányú 1,2,4-triklórbenzol (CAS regisztrációs szám: 120-82-1) és hexaklórbenzol (CAS regisztrációs szám: 118-74-1) keverékét (CIB) 1 cm<sup>3</sup> 0,015%-os etanol vizes oldatában kapták naponta 0,1 µg/ts.kg és 1 µg/ts.kg dózisban gyomorszondán keresztül. A CIB-t célkitűzésünkben is megfogalmazott igények szerint választottuk modellvegyületnek, mint a POP/EDC vegyületek környezeti modelljét. A CIB expozíció dózisa és időtartama [91, 92, 93] szakirodalmi előzmények és a kívánt céljaink megvalósítási igényei szerint kerültek kialakításra.

A patkányok CIB expozíciója 30 (n=10, CIB-30 csoport), 60 (n=10, CIB-60 csoport) vagy 90 (n=10, CIB-90 csoport) napig zajlott. Kontroll-rendszerünkben a csak tubus levezetéssel stressz kontrollt (SK) /30 (n=5, SK-30 csoport), 60 (n=5, SK-60 csoport) vagy 90 (n=5, SK-90 csoport)/ és abszolút kontrollt (AK) kezeletlen csoportként (n=10) használtunk (8. ábra). Negatív kontrollként (-K) alkalmazott csoportnak csak ivóvizet adtunk, pozitív kontrollként

(+K) a CIB oldószerével kezeltük mindenben azonos módon a kísérletbe bevont állatcsoportokat.

A kísérleti kontroll-rendszer eredményeinek elemzése során nem észleltünk statisztikailag értékelhető eltéréseket, így csak az AK és az SK csoportokat jelentettük meg protokoll táblánkon és az eredmények interpretálásánál.



**8. ábra. A kísérleti protokoll bemutatása**

1. Kezelési időtartam és az expozíciós módok megjelenítése.
2. A viselkedés vizsgálatok (open-field teszt (OF), a 2. napon az elevated plus maze teszt (EPM), resident-intruder (RI) teszt).
3. Kezelések szerinti mintavételek (vér: májenzimek; szövetminták: toxikológiai vizsgálatok).
4. Statisztikai analízis, kiértékelés.

A CIB expozíciókat követően a kontrollrendszer állatcsoportjainál a szorongással összefüggő, a lokomotoros és az exploratív viselkedés elemeit az open-field (nyitott mezős) teszttel, a hímek közötti agresszív viselkedést semleges ketrecben a resident-intruder tesztekkel tanulmányoztuk.

Az utolsó viselkedési tesztvizsgálat után az állatok testtömegét mértük, azonos körülmények mellett dekapitáltuk, majd vérmintákat gyűjtöttünk a máj-toxicitás követése céljából: serum glutamate pyruvate transaminase (SGPT) [94], serum glutamate oxaloacetate transaminase (SGOT) [94], a gamma glutamyl transferase (GGT) [95] és a lactate dehydrogenase (LDH) [96] enzimek meghatározásához [97]. Emellett morfo-toxicológiai vizsgálatokat is végeztünk. A vérbegyűjtés után az agyat, a májat, a lépet, a veséket, tüdőket, generatív szerveket, farkat, bőrt, bőr alatti kötőszövetet steril körülmények mellett eltávolítottuk, és tömegüket

megmértük. CIB okozta toxicitásra utaló jeleket [98, 99] - például: alopecia, bőr megvastagodás, hegesedés és erythemák - monitoroztuk, és az általános morfológiai vizsgálatokat az adott szervekből származó metszetekből hagyományos szövettani festésekkel (pl. haematoxylin-eosin festéssel /HE/ [100, 101]) egészítettük ki. A megfelelő szervekből, azokból steril mintavétel után primer, monolayer sejtkultúrákat állítottunk elő a további *in vitro* vizsgálatokhoz [90].

Az expozíciókhoz és a hisztológiához a kemikáliákat, a sejtkultúrához felhasznált anyagokat és egyszerhasználatos steril tenyésztő edényeket a Sigma - 154 Aldrich (St. Louis, MO), Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA) vagy BD-155 Biosciences (San Jose, CA) cégektől szereztük be. Minden kémiai anyag analitikai tisztaságú volt. A sejtek tenyésztéséhez 20%-os Foetal Calf Serum (FCS) antibiotikumokkal szupplementált Dulbecco's Modified Eagle Essential Medium-ot használtunk, alkalmaztunk [90, 102, 103, 104, 105].

#### **3.1.1.1. Viselkedés vizsgálatok**

A tesztekben minden állatot a standard követelmények szerint csak egyszer használtunk. Minden tesztvizsgálat a sötét (aktív) fázis azonos óráiban történt. A tesztek azonos körülmények mellett, 1 órás, a helyiséghez való habituációs időt követően indítottuk el. Az állatokat véletlenszerű sorrendben vettük ki a ketreceikből a vizsgálathoz. A kísérleti apparátust minden próba előtt etanollal megtisztítottuk, hogy elimináljuk a kellemetlen szagokat. A viselkedést a tesztapparátus felett, a mennyezetre erősített kamerával, illetve egy hozzá kapcsolt viselkedési szoftver: az Ethovision (v2.3, Noldus Information Technology, Wageningen, Hollandia) segítségével rögzítettük. Minden teszt analízisében részt vett legalább egy független vizsgáló is, akinek feladata a megfigyelési szempontok szerinti adatrögzítés volt [90, 106, 107, 108].

#### **3.1.1.2. Open-field teszt**

Az open-field (OF) teszttel tanulmányozhatók a szorongás és a lokomotoros aktivitás viselkedéssel összefüggő elemei. A kísérleti állatot egy felülről nyitott, kerek (80 cm átmérőjű, 45 cm magas), műanyag, feketére festett aréna közepére helyezzük, és mérjük a centrumban és a periférián eltöltött időt százalékban, a teljes megtett utat, az átlagsebességet és a mozgással eltöltött időt, az állat felágaskodásainak, vakarózásainak, a szippantásainak/szimatolásainak, freezing-eknek és a székletürítéseinek a számát a teszt 5 perces vizsgálati periódusában [106].

### **3.1.1.3. Resident-intruder teszt**

A resident-intruder (RI) teszt az agresszió vizsgálatára irányul, melyre a CIB kezelések hatást gyakorolhatnak. A tesztvizsgálat során a resident (bentlakó) állatot az aréna közepére helyeztük és 5 percig habituálódni hagytuk. Az aréna egy semleges ketrec, melyet beszórtunk nem használt, tiszta forgáccsal és befedtük átlátszó műanyag tetővel. Az OF tesztben mért lokomócióval, a felfedező és az önvédő magatartással összefüggő paramétereket rögzítjük a habituáció és az azt követő bentlakó-betolakodó teszt során. A habituáció után az intruder (betolakodó) állatot a resident állat mellé helyezve a különböző, a resident állat offenzív (az agresszív vakarózási epizódok, laterális irányú fenyegetés, fenyegető testtartás, üldözés és harapásos támadások teljes időtartama és száma), defenzív (a defenzív függőleges testtartás és mozdulatlanság teljes időtartama és száma) és szociális (naso-nasalis és naso-genitalis kapcsolatok) viselkedési elemeit vizsgáltuk a teszt 5 perces időszávjában [107].

### **3.1.1.4. Viselkedési protokollok statisztikai analízise**

Eredményeinket ANOVA programcsomaggal értékeltük ki. Két-utas analízist használtuk. Eredményeinket a  $\text{mean} \pm \text{standard error of mean (SEM)}$  formában tüntettük fel. Az alkalmazott tesztek szignifikancia szintje  $p < 0,05$  volt [90].

### **3.1.2. Beteganyag gyulladás-követési protokoll**

A nyelőcső toxicitás értékelési eljárási protokollja szerint kívántuk követni a környezeti expozíciós modellként szolgáló mesterséges ionizáló sugárzás ( $\Sigma$  67-71 Gy), nem target célú felhasználása kapcsán megjelenő hatását, melyet a nyelőcsőre vonatkoztatva mutatunk be. Ebben az eljárásban az egész nyelőcsövet kontúrozzuk az anularis porctól a gastrooesophagealis átmenetig. Analizáltuk a dozimetriás adatokat a nyelőcső vonatkozásában. AET-t (acute esophageal toxicity), mint nyelészavart a Nemzetközi Daganat Intézet által kiadott „Common Terminology Criteria for Adverse Events” 3.0 verziója alapján prospektíven határoztuk meg (1. táblázat) [109]. A toxicitás legsúlyosabb mértékét vettük figyelembe.

Grade 1	Tünetek, diéta elegendő ( <i>pre-gyulladásos folyamat</i> )
Grade 2	Tünetek, megváltozott étkezés/nyelészavar (pl.: megváltozott étkezési szokások, per os kiegészítés); iv folyadék szükségesség <24 óra ( <i>akut mérsékelt gyulladásos folyamat</i> )
Grade 3	Tünetek és súlyosan megváltozott étkezés/nyelészavar (pl.: inadekvát szájon keresztüli kalória- és folyadékfelvétel); iv folyadékpótlás, szondatáplálás vagy TPN indikált $\geq 24$ óra ( <i>akut súlyos gyulladásos folyamat</i> )
Grade 4	Életet veszélyeztető szövödmény (pl.: elzáródás, perforáció)
Grade 5	Halál

**1. táblázat: Nyelési nehezítettség súlyossága a „Common Terminology Criteria for Adverse Events, 3.0 verzió” alapján**

### 3.1.2.1. Statisztikai analízis

SPSS 15.0 Windows verziót használtunk minden analízishez. Az AET, a kor, a nem, a dohányzási szokások és a kemo-radioterápiás kezelés részletei (dózis és volumen) közötti összefüggéseket értékeltük. A dózis és a volumen értékelése egy-utas ANOVA és T-teszttel történt. A dózis-volumen paraméterek és az AET súlyossága közötti összefüggés analízisére logistic regression-t alkalmaztunk [110, 111].

### 3.2. In vitro modellek

*In vitro* vizsgálataink során monolayer, primer sejt kultúrákat állítottunk elő, az egyed alatti szerveződési szintek élő tulajdonságainak vizsgálatára. Egyrészt a fent leírt CIB kezelési protokollban résztvevő állatok megfelelő szervmintáiból, másrészt különféle humán daganatos szövetmintákból pl. tüdő, kötőszövet, csont készültek a kutatási modellek. (A betegcsoportok kijelölése az *in vitro* PEHE kutatási feladatokhoz a Pálföldi és mtsai által [112] közölt cikk szerint történt.).

Munkacsoportunk által már kidolgozott hipofízis, glia és idegsejt - humán és patkány - primer, monolayer sejtenyészetek kialakításának standardizált metodikájának [104, 105, 113] felhasználásával dolgoztuk ki a tüdő és tüdőtumorok sejt kultúra kialakítási módszereit. Az intrabronchiális és műtéti objektumokból származó steril, egészséges és tumoros szövetminták egy részét makroszkópos szeparálást követően enzimatikusan emésztettük (37 °C, 0,2%-os tripszin /Sigma/ foszfát pufferben (PBS) 20 percig, majd 0,17 µg/ml kollagenázzal /Sigma/ 60 percig és 1%-os diszpázzal /Sigma/ 30 percig). Az enzimátikus

disszociációt  $100 \mu\text{g}/\text{cm}^3$  tripszin inhibitorral és 20%-os foetal calf serum-val (FCS) állítottuk le ( $4^\circ\text{C}$ ). A szövet mechanikus disszociáltatása nejlon-blutex (pórus  $\varnothing$ :  $48\mu\text{m}$ ) szűrővel történt. A sejt viabilitása 98-100% (trypan blue teszt). A sejteket 24 lyukú 5-100% IV. típusú kollagénnel fedett műanyag tenyésztő edénybe (Nunc, Orlando, FL, USA),  $10^5$  sejt/ $\text{cm}^3$  koncentrációban, Dulbecco's féle módosított Eagle's mediumba (Sigma) + 20% FCS (Gibco, New York, USA), 1 IU/ml penicillinnel és 1 IU/ml streptomycinnel szupplementált módon helyeztük ki. A háromdimenziós (3-D) kultúrákat kollagénnel (10%) kezelt filterre ( $\varnothing$ :  $48 \mu\text{m}$ ) ültettük, és  $37^\circ\text{C}$ -on, 5%-os  $\text{CO}_2$  termosztátban inkubáltuk. A kultúra tápoldatát 1-3 naponta cseréltük. A normál és tumoros explant kultúrákat tripszin (0,2%, 30 percig) és tripszin inhibitor kezelés (Nunc, Orlando, FL, USA) után Petri csészékbe ( $3\text{cm } \varnothing$ ) helyeztük.

A szövetminták más részletéből explant kultúrákat készítettünk. Az explant kialakításakor 5 perces tripszin kezelést követően, preparáló mikroszkóppal látható méret-tartományban, metszéspelületeket hoztunk létre a szöveteken. Ezután hideg ( $4^\circ\text{C}$ -os), 20%-os FCS alkalmazásával állítottuk le az emésztő enzimhatást. Majd háromszor mostuk fiziológiás oldatban a szövetdarabokat, és felületkezelt tenyésztő edényekbe helyeztük tápfolyadék-cseppben letapadási módszert alkalmazva. A felületi megkötődés után (3h) a monolayer kultúránál leírt komplexitású és típusú folyadékágyba helyeztük a szövetmintákat. Az explant kultúrákat az azonos korú monolayer tenyészetekkel hasonló módon használtuk vizsgálatainkhoz.

Sejtkultúrákat készítettünk normál (kontroll (C) és tumoros (Tu) szövetekből /PEHE/, különböző kémiai terhelések dózis- és időfüggését vizsgálva a három *in vitro* modellrendszerben. Három vizsgálati típust különíthettünk el:

I.: ép szöveti részekből - alacsony proliferációs ráta, és kontaktgátlás - ezt tekintettük kontrollnak.

II.: a tumoros klónból - térorientációs zavar és kontaktgátlást veszített sejtekből - PEHE Tu.

III.: kevert: normál és tumoros sejtek - PEHE M.

### **3.2.1. Sejtkultúrák vizsgálata, proliferációs aktivitás követés**

**Fehérjetartalom meghatározás:** Az összfehérjetartalom mérését módosított Lowry módszerrel és Pierce BCA Protein Kit (Thermo Fisher Scientific INC., Rockford, IL, USA) alkalmazásával valósítottuk meg [114, 115].

**Inkorporációs vizsgálatok:** A sejtsztódási gyakoriságot  $^3\text{H}$ -Thymidine inkorporációs teszttel követtük [116, 117].

**Viabilitási vizsgálatok:** trypan blue teszt segítségével kerültek meghatározásra [118, 119].

### 3.2.2. Hisztológiai vizsgálatok

A betegcsoportok szövetszövetmintáiból, valamint sejtkultúrákból történtek az immunhisztokémiai vizsgálatok az alábbiak szerint.

**BCL2:** A paraffinba ágyazott 4 µm vastagságú metszetek indirekt peroxidáz módszerrel kerültek feldolgozásra [120, 121]. A metszetek további kezelése Prae-Treatment module-lal történt (Dako, Glostrup, Denmark).

**MDR1:** Az MDR1 expressziót immunhisztokémiaileg paraffin metszetek indirekt peroxidáz módszerrel történő festésével határoztuk meg. (Az eljárás antitest specifitásban különbözött csak a BCL2 módszernél leírtaktól [122, 123].)

**CD34:** A CD34 pozitivitást immunhisztokémiaileg paraffin metszetek indirekt peroxidáz módszerrel történő festésével határoztuk meg. (Az eljárás antitest specifitásban különbözött csak a BCL2 módszernél leírtaktól [124, 125].)

**CD31:** A CD31 pozitivitást immunhisztokémiaileg paraffin metszetek indirekt peroxidáz módszerrel történő festésével határoztuk meg. (Az eljárás antitest specifitásban különbözött csak a BCL2 módszernél leírtaktól [124, 126].)

**Ki67:** A Ki67 pozitivitást immunhisztokémiaileg paraffin metszetek indirekt peroxidáz módszerrel történő festésével határoztuk meg. (Az eljárás antitest specifitásban különbözött csak a BCL2 módszernél leírtaktól [124, 127].)

**VIII. faktor:** A VIII. faktor pozitivitást immunhisztokémiaileg paraffin metszetek indirekt peroxidáz módszerrel történő festésével határoztuk meg. (Az eljárás antitest specifitásban különbözött csak a BCL2 módszernél leírtaktól [128].)

**Ösztrogén, progeszteron receptor:** Az ösztrogén és progeszteron receptor pozitivitást immunhisztokémiaileg paraffin metszetek indirekt peroxidáz módszerrel történő festésével határoztuk meg. (Az eljárás antitest specifitásban különbözött csak a BCL2 módszernél leírtaktól [129, 130].)

Szemikvantitatív értékelési módszerrel történt a fenti antigén expressziók besorolása: 0: 0-1% a pozitív sejtszám/felületegység, 1+ akkor, ha 2-33% közötti +sejt; 2+ ha 34-66% közötti +sejt, 3+ akkor ha, 67%-tól a +sejtszám. Kevert besorolás esetén két vagy több antigénexpresszió 0; 1+ jelenléte igazolt.

### 3.3. Kémiai és fizikai expozítorok

A klórbenzolok (CIB) expozítoroként történő alkalmazása [90] során igazoltan szubtoxikus dózist használtunk mind az *in vivo*, mind az *in vitro* állatkísérletes vizsgálatok során.



*Taxánok* (TX) hatásainak vizsgálatánál a taxán-alapú kemoterápiás kezelésben (paclitaxel: TAX 175 mg/m<sup>2</sup>) részesülő betegcsoportokat [110, 111] vontuk be. A szövetmintákon történt az *in vitro* vizsgálatok a megfelelő szubtoxikus dózisokban (paclitaxel: 0,6 ng/ml, docetaxel: 10<sup>-6</sup> M/ml) folytak.

Fizikai expozícióként szubtoxikus dózisu, a mesterséges ionizáló sugárzások hatásvizsgálatának modellezésére radio-kemoterápiás protokollokat alkalmaztuk beteganyagon (sugárdózis: 25x1,8 Gy = 45 Gy + boost: 22-26 Gy, teljes dózis: 67-71 Gy). A target a makroszkopikus tüdő tumor volt. Emellett a nem-célzott szövetek, pl. nyelőcső érintettségét is vizsgáltuk. Ebben a kontextusban a környezeti expozíciók gyulladáskiváltásával kapcsolatos következményeit követtük a 3.2. fejezet szerint.

### **3.4. Ionmilieu változás vizsgálata**

Kísérleti protokoll

Leletezett Wistar törzsű ♀, 120-250g súlyú, 4-6 hetesek patkányok (Charles River, Isaszeg, Magyarország) egészséges és prolaktinómás hipofízisből (PRLoma) készítettünk sejt kultúra modelleket.

Prolaktinómás hipofízis indukálása során a standardizált körülmények között (10 fős csoportokban) tartott kísérleti állatokat 6 hónapon át subcutan adott ösztronacetáttal (CAS regisztrációs szám: 901-93-9, Sigma, Germany, 150 µg/ts.kg/hét) kezeltük. A kezelés eredményeként 6 hónap alatt az állatok hipofízisében prolaktinómát detektáltunk. Ezekből a prolaktinómás adenohipofízisekből, valamint a nem kezelt patkányok egészséges adenohipofíziseiből készítettünk primer, monolayer standardizált sejtenyészeteket.

Kutatási protokollunkban először az alap ACTH (adrenocorticotrop hormon) és PRL (prolaktin) szinteket határoztuk meg Radioimmunoassay módszerrel (RIA) [102, 103] mind a normál adenohipofízis (Adh), mind a prolaktinómás tumoros adenohypophysis (PRLoma) tenyészetek felülúszó médiumaiból (Tyrode's medium /Sigma, Germany/). Kísérleteink során a médiumban csak a [K<sup>+</sup>] vagy [Na<sup>+</sup>] volt módosított az izoállapotok (ionia, hidria, ozmózis stb.) megtartásával. A primer sejt kultúrák hormonelválasztását extracelluláris hipokalémiában ([K<sup>+</sup>]: 0mM; n=10) és hiponatrémiában ([Na<sup>+</sup>]: 0mM; n= 8) vizsgáltuk. A kezelést követő 10., 20., 30., 40., 60. és 90. percben vettünk mintát a hormonelválasztás időkinetikai követéséhez. Az expozíciós dózishatás és idősav alapján beállított kísérleti protokoll szerint gyűjtöttük az Adh és PRLoma felülúszó mintákat (és -80 °C-on tároltuk), melyekből PRL és ACTH hormontartalmat detektáltuk RIA módszerekkel. Meghatároztuk a fehérjetartalmat is a 3.3.1. szerint leírtakkal egyező módon.

### **3.4.1. PRL és ACTH hormon meghatározások**

A meghatározáshoz a kísérleti minták felülúszó médiumaiból Molnár és mtsai. [131] által közölt cikkben leírtak szerint jártunk el.

### **3.4.2. Statisztikai analízis**

Az Adh-ban és PRLomában történő különböző kezelés hatásának összehasonlításához a két-utas, az ismétlődő mérésekhez az ANOVA tesztet használtuk. A statisztikai analízishez a SPSS 17. verziójú szoftvert, a grafikus megjelenítésekhez pedig a SAS 9.2. szoftvert (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) alkalmaztuk [131].

### **3.4.3. Immuncitológiai vizsgálatok**

A vizsgálat 90. percénél, a 0 mM  $[K^+]$  vagy  $[Na^+]$  tartalmú Tyrode oldattal kezelt monolayer és kontroll Adh és PRLoma kultúrákat 4%-os paraformaldehidben fixáltuk.

A monolayer kulturák immunhisztokémiai vizsgálatát anti-Bcl2 alkalmazásával a peroxidáz/antiperoxidáz módszerrel határoztuk meg a Molnár és mtsai [131] publikációjában közöltek szerint.

## **3.5. Hiponatrémia prediktív jellegének vizsgálata betegcsoporton**

A Csongrád Megyei Mellkasi Betegségek Szakkórházának Tüdőgyógyászati Tanszékén (2010.01.01.-2014.07.01 között) diagnosztizált kissejtes tüdőkarcinómás betegek képezték vizsgálati mintacsoportunkat, melynél a szérum hiponatrémia előfordulási gyakoriságát és súlyosságát, valamint ennek a túléléssel összefüggésbe hozható hatásait tanulmányoztuk [132, 133, 134].

### **3.5.1. $Na^+$ szint meghatározás szérumból**

EasyLyte típusú készülékkel történt a  $Na^+$  szint meghatározás, melynek során az ismert koncentrációjú standard oldat, valamint a minta (szérum) oldatban mért potenciál különbségből számítható ki a mintában levő nátrium ionkoncentráció [135].

## 4. Eredmények

### 4.1. Expozítor vizsgálatok modellezése

A környezeti expozíciók közül a kémiai terhelések tekintetében választott taxánok dózisainak meghatározása orvos-biológiai és gyógyszerkémiai kutatások alapján meghatározott (paclitaxel: 135-220 mg/m<sup>2</sup>/3 hét [136, 137, 138], docetaxel: 75-100 mg/m<sup>2</sup>/3 hét [138, 139]). A klórbenzol mix (triklórbenzol:hexaklórbenzol=1:1) kísérleteinkben alkalmazható dózisainak meghatározásához elvégeztük a kinetikai vizsgálatokat, és a D1: 0,1 µg/ts.kg; D2: 1 µg/ts.kg dózisokat választottuk vizsgálatainkhoz. Eredményeink szubtoxicitást igazoltak, melyet a 2. táblázatban feltüntetett adatok mutatnak.

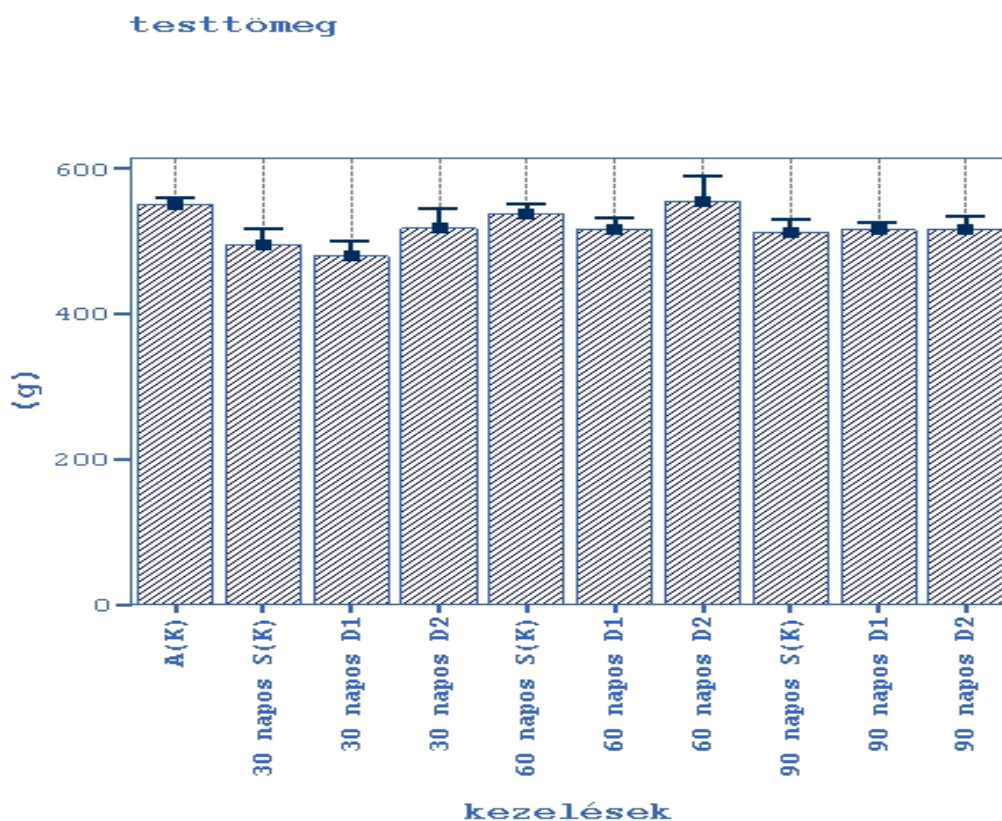
NE/1	normál tartomány	kísérleti csoportok			
		kontroll	D2-CIB-30	D2-CIB-60	D2-CIB-90
SGOT	30 – 250	127,88±2,83	146,46±2,03 <sup>A</sup>	155,16±3,98 <sup>B</sup>	125,68±3,57
SGPT	50 – 200	54,55±2,09	57,86±1,94	58,30±1,57	50,82±2,26
GGT	2 – 20	3,44±0,07	3,91±0,09	4,37±0,58 <sup>A</sup>	3,67±0,07

#### 2. táblázat. A klórbenzol expozíciók hatása a toxicitást jelző májenzim értékekre

átlag±SEM, n=10/kontroll vagy n=10/CIB csoportok. D2-CIB: 1 µg/ts.kg, 30, 60, 90 jelek a dózis mellett a kezelési időtartamokat mutatják napokban. Az adatokat ANOVA módszerrel, LSD post hoc teszttel elemeztük, és a szignifikancia értékeket (**A**:  $p < 0,05$ , **B**:  $p < 0,001$ ) a kontrollokhoz képest adtuk meg. Az irodalmi adatok alapján megadott szubtoxikus expozíciók esetén megjelölt értékeket „normál tartomány” megnevezéssel jelöltük.

A klórbenzol expozíciók diszkrét változásokat indukáltak a SGOT, az SGPT, GGT értékekben. Ugyanakkor a mért koncentrációk a kezelések során az irodalmi adatok szerinti (2. táblázat, „normál tartomány”-ként jelölt) szubtoxikus tartományban maradtak. Az anyagcseremarkerek itt megjelölt adatai szerint az alkalmazott dózis (1 µg/ts.kg) biztosan szubtoxikus tartományban volt.

Az esszenciális szervek (máj, vese, mellékvese, lép, szív, tüdő, gyomor stb.) tömegét megmértük, de nem találtunk szignifikáns eltérést az egyes csoportok között (9. ábra). A kísérleti modellállatokon és szerveiken nem tapasztaltunk külső malformációkat, sem esetleges toxicitásra utaló egyéb jeleket. Eredményeink arra utalnak, hogy az alkalmazott D1 és D2 CIB expozíciók is szubtoxikusak voltak, melyet a testtömeg követésével is igazoltunk.



**9. ábra. Krónikus CIB kezelés hatása Wistar törzsű ♂ patkányok testtömeg változásaira** (n=10/csoport, X±SEM; kezelés típusai: D1: 0,1 µg/ts.kg; D2: 1 µg/ts.kg)

A TX orvosi gyakorlatban alkalmazható dózisa a terápiás gyakorlatból ismertek (paclitaxel esetén: 135-220 mg/m<sup>2</sup>/3 hét, nem kissejtes tüdőrák (NSCLC) esetén alkalmazott dózis: 175 mg/m<sup>2</sup>/3 hét [137, 138]; docetaxel esetén 75-100 mg/m<sup>2</sup>/3 hét, NSCLC esetén 75 mg/m<sup>2</sup>/3 hét [138, 139]). A fent említett kezelési koncentrációkat alkalmaztuk a betegcsoportoknál. Az *in vitro* vizsgálatok során alkalmazott dózisos meghatározásához idő- és dózis-kinetikai vizsgálatokat végeztünk, és ezen vizsgálatok eredményeinek megfelelően alkalmaztuk a dózisoskat (paclitaxel (Tax); 0,6 ng/ml, docetaxel (Ttx): 10<sup>-6</sup> M/ml [112]).

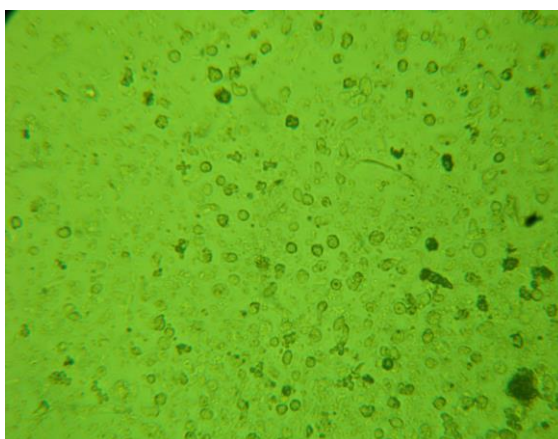
Elektromágneses sugárzások közül a mesterséges ionizáló sugárzások alkalmazható dózisainak meghatározása az orvos- és sugár-biológiai szakirodalmakból ismert (30-70 Gy, [140]). Vizsgálatainkhoz ezen orvosi gyakorlatban alkalmazható tartományban használtuk a sugárdózisoskat (67-71 Gy [111]).

#### **4.2. *In vitro* vizsgálati modellek standardizálása**

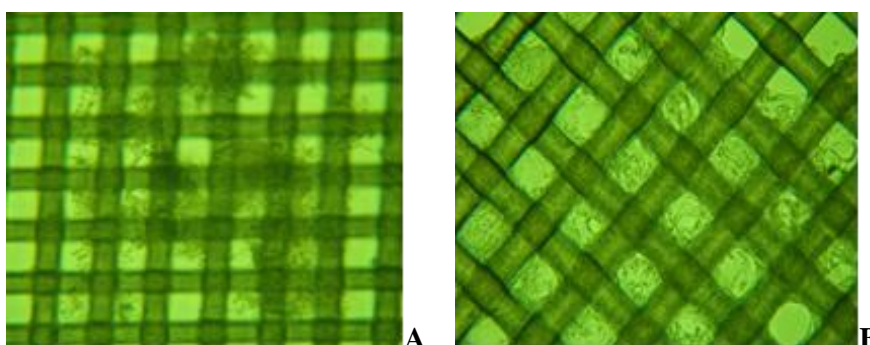
*In vitro* vizsgálatainkhoz kialakítottuk azt a primer, monolayer (1. kép) sejt kultúra modellrendszert, amelyet minden esetben az adott jellemző marker szerint (pl.

végdifferenciált sejtfunció [131]) is standardizáltunk. A metodikai azonosság megtartása érdekében további (viabilitási kontroll, adhezivitási kontroll, sejtproliferáció követési kontroll, morfológiai kontroll, konfluens jelleg kontroll stb.) rendszeres standardizálási lépéseket hajtottunk végre. A kísérleti modellek alkalmazhatóságának biztosítását azok primer jellege nagyban támogatta, ugyanakkor emiatt a metodikai „jó-gyakorlat” kialakítása sok esetben nagyon eltérő megoldásokat követelt, elsősorban a transzformált sejtípusok esetén.

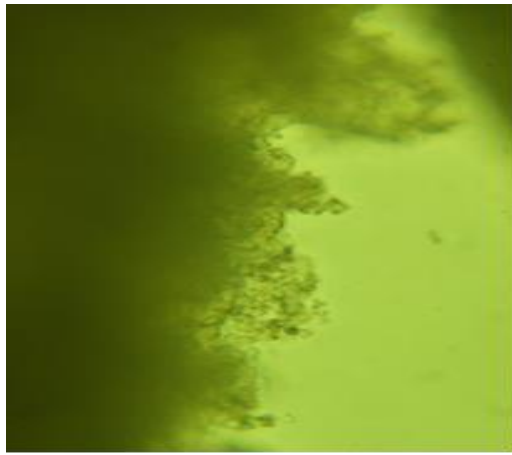
A humán eredetű transzformált sejtek viselkedés-dinamikájának követése során felmerült az eredmények későbbi terápiás alkalmazhatósági biztonságát garantáló igény, amit az explant (szövetkihelyezés; 3. kép) és 3D (három dimenziós) (2. A, B kép) kultúrák kialakítása és alkalmazása támogatott. A monolayer kultúrán (1. kép) karakterisztikusan kirajzolódott transzformált sejtklónok láthatók. A 2. kép mutatja, hogy a 3D kultúrák sejtjei térorientációs zavarral rendelkeznek, mert szabálytalanul nőnek be a rendelkezésükre álló felületeket, és a klónokra jellemzően több dimenziós osztódási irányt mutatnak.



**1. kép. Monolayer Tu PEHE sejt kultúra (OM: 65x)**



**2. kép. Tu PEHE 3 D (A: OM:45x, B: OM:65x)**



**3. kép. Tu PEHE explant kultúra (OM: 50x)**

#### **4.3. *In vivo* vizsgálati protokollok kialakítása és standardizálása**

A betegcsoportok [110, 111] kezelési protokollja az adott szakmai kollégiumok ajánlásainak megfelelően került meghatározásra és követésre [141].

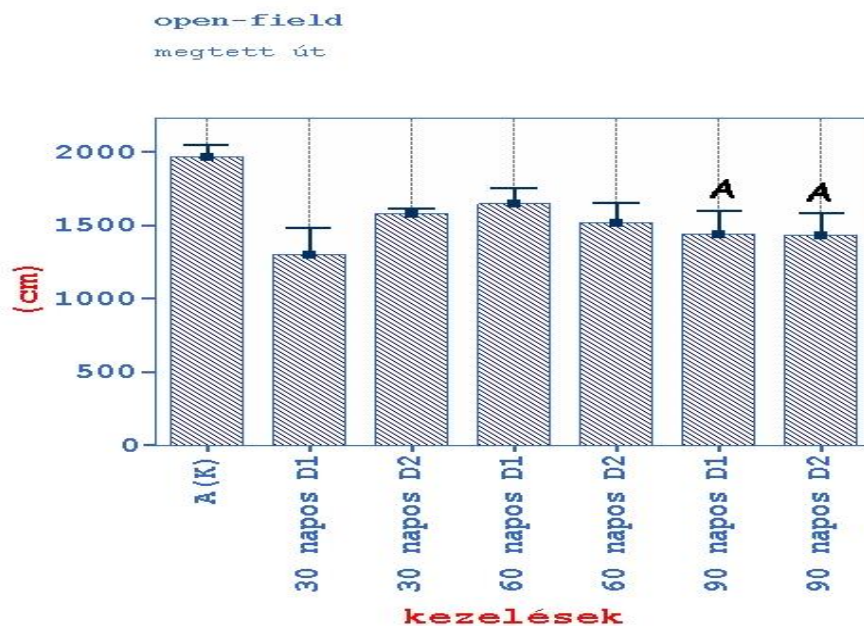
A kísérleti munkába bevont állatok viselkedés mintázatainak követéséhez a nemzetközi standardokat alkalmaztuk [106, 107, 108].

Az *in vivo* vizsgálati protokollok a fenti objektív követelményeknek megfelelően kerültek standardizálásra az aktuális kutatási területekhez.

Ezután a statisztikai adatelemzések követelményei szerint kerültek meghatározásra a standardizált vizsgálati feltételek mellett kialakítandó mintaszámok.

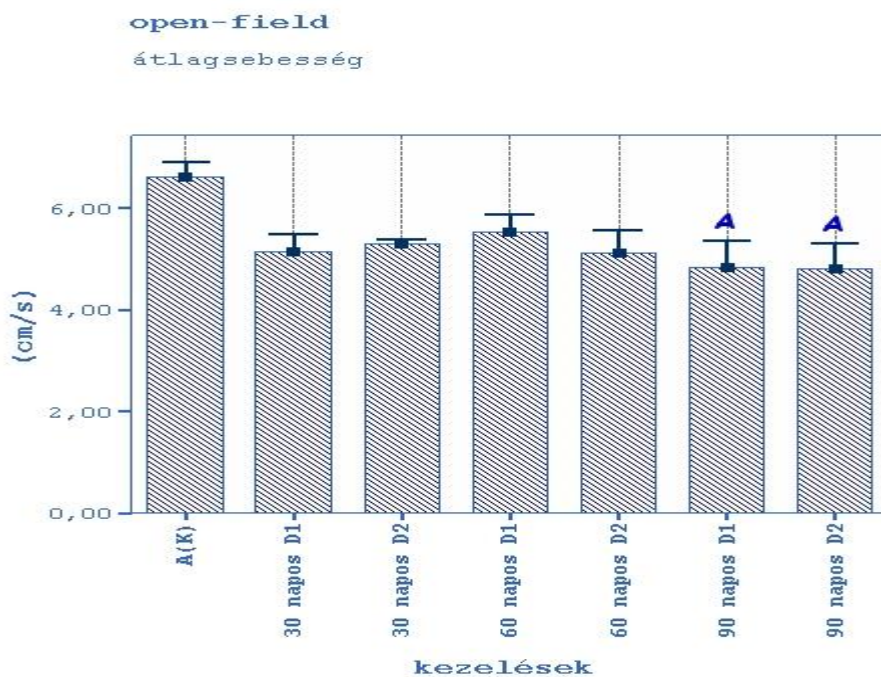
#### **4.4. A CIB expozíciók hatása a viselkedéselemekre**

A környezeti kémiai terheléses *in vivo* vizsgálatokban szubtoxikus (0,1 és 1  $\mu\text{g}/\text{ts.kg}$ ) dózisú (2. táblázat, 9. ábra) CIB-t alkalmaztunk krónikus kezelési sémában (30, 60 és 90 napig). Az open-field viselkedés vizsgálatokban detektált eredményeinket a 10.-13. ábrákon mutatjuk be.



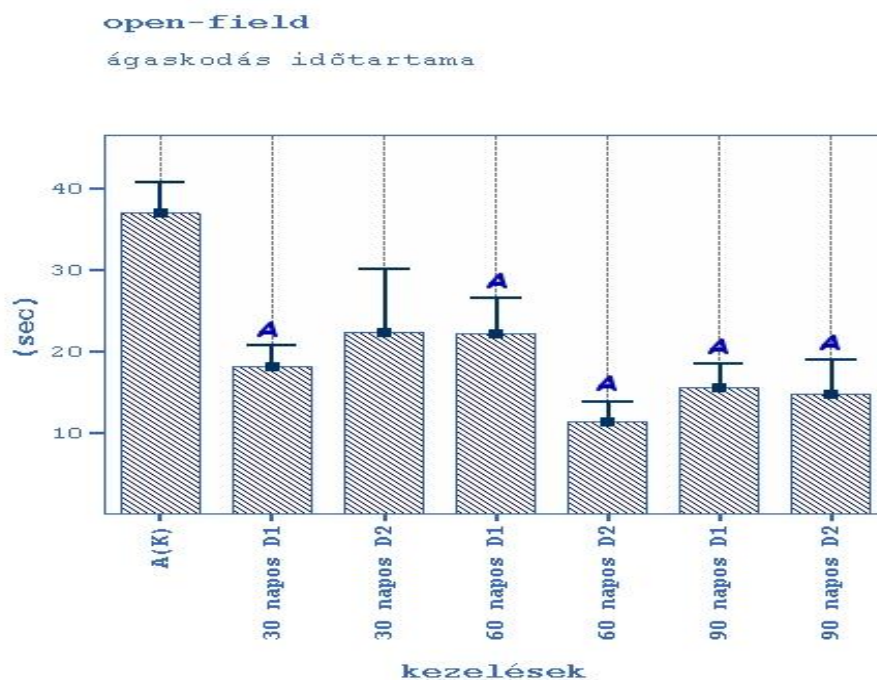
**10. ábra. CIB kezelések hatása a szorongást jelző lokomotoros aktivitás - mozgás során megtett távolsággal jellemezhető - változásaira**

(n=10/csoport; A  $p < 0,05$  a kezelés/A(K) relációban; kezelés típusai: D1: 0,1  $\mu\text{g}/\text{ts.kg}$ ; D2: 1  $\mu\text{g}/\text{ts.kg}$ )



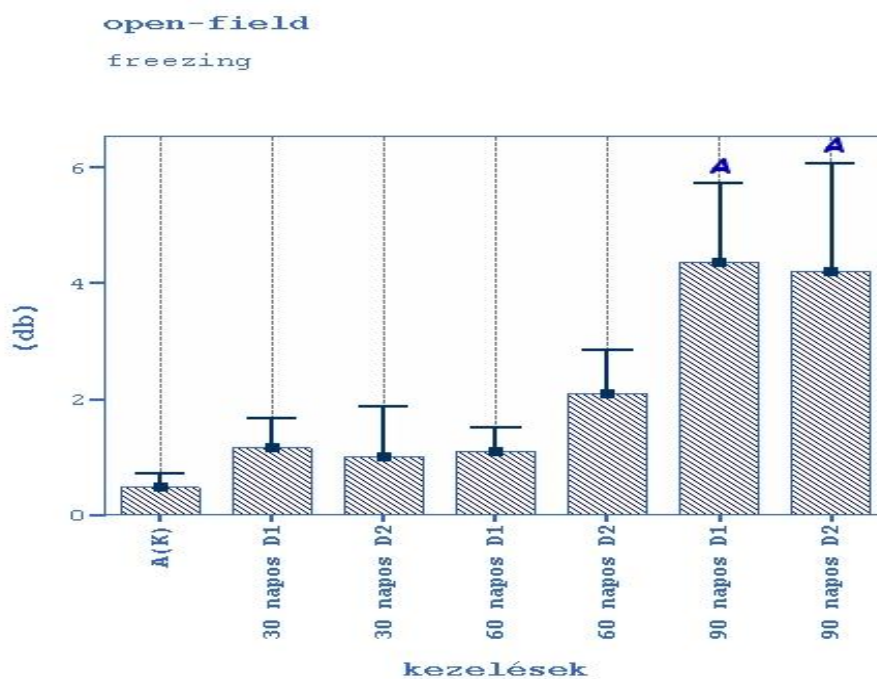
**11. ábra. CIB kezelések hatása a szorongást jelző lokomotoros aktivitás - a mozgás sebessége - változásaira**

(n=10/csoport; A  $p < 0,05$  a kezelés/A(K) relációban; kezelés típusai: D1: 0,1  $\mu\text{g}/\text{ts.kg}$ ; D2: 1  $\mu\text{g}/\text{ts.kg}$ )



**12. ábra. CIB kezelések hatása a szorongást jelző felfedező aktivitás - ágaskodás időtartama - változásaira**

(n=10/csoport; A  $p < 0,05$  a kezelés/A(K) relációban; kezelés típusai: D1: 0,1  $\mu\text{g}/\text{ts.kg}$ ; D2: 1  $\mu\text{g}/\text{ts.kg}$ )



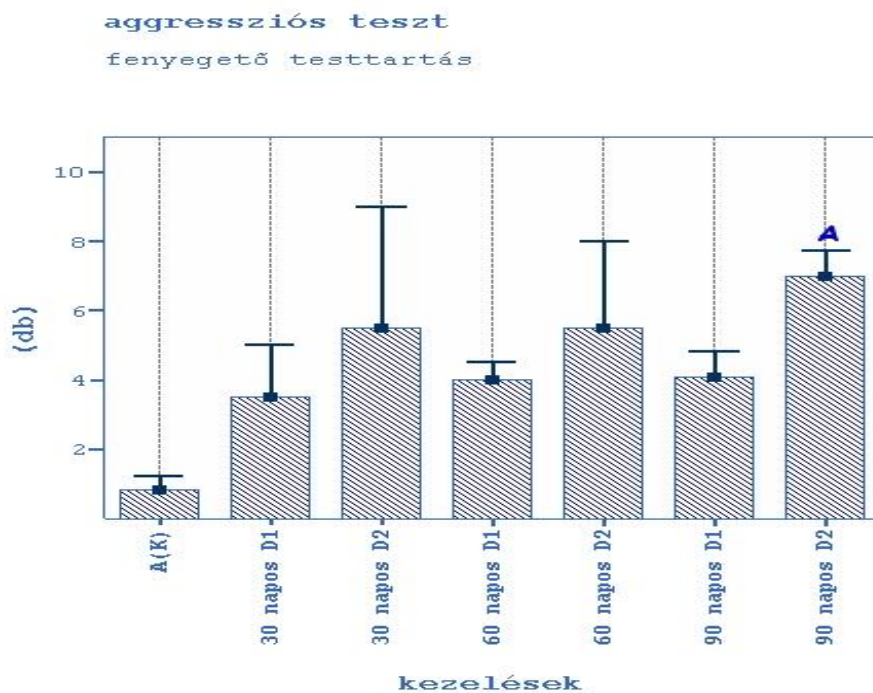
**13. ábra. CIB kezelések hatása a szorongást jelző „freezing” változásaira**

(n=10/csoport; A  $p < 0,05$  a kezelés/A(K) relációban; kezelés típusai: D1: 0,1  $\mu\text{g}/\text{ts.kg}$ ; D2: 1  $\mu\text{g}/\text{ts.kg}$ )



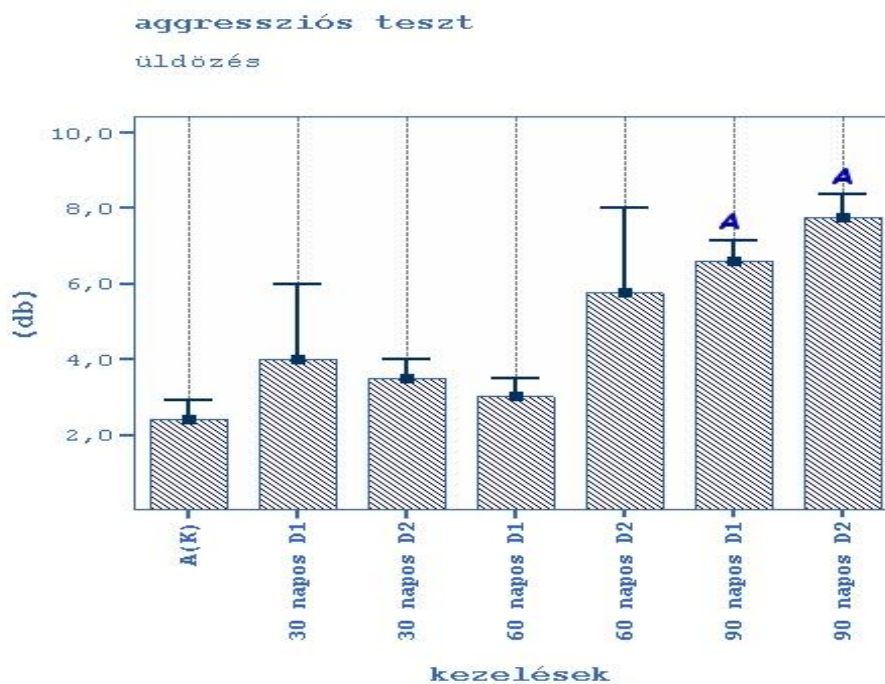
A CIB kezelt patkányok „open-field” teszttel tanulmányozható viselkedés elemei szignifikánsan csökkentek, vagy a kontrollhoz képest modulálódtak (10.-13. ábra). A vizsgált CIB dózisok krónikus jelenléte, a kezelés időtartamától függően egyre érdektelenebbé, figyelmetlenebbé, szorongóbbá, és kevésbé alkalmazkodóvá tette az állatokat. Látható, hogy a 0,1 µg/ts.kg dózisú CIB esetén sikerült azt a küszöb dózist megtalálni, amelynél már nem minden hatás azonos irányú a megelőző nagyobb (1 µg/ts.kg) dózis kiváltotta következményekkel.

A resident-intruder tesztekkel végzett agressziós vizsgálatok során az extrém alacsony dózisú (D1: 0,1 µg/ts.kg; D2: 1 µg/ts.kg) CIB kezelések hatásait követtük az agresszív viselkedéselemekre: fenyegető testtartás, üldözés stb. (14.- 15. ábra).



**14. ábra. CIB kezelések hatása az agressziót jelző társas viselkedéselemek közül a fenyegető testtartásra**

(n=10/csoport; A p< 0,05 a kezelés/A(K) relációban; kezelés típusai: D1: 0,1 µg/ts.kg; D2: 1 µg/ts.kg)



**15. ábra. CIB kezelések hatása az agressziót jelző társas viselkedéselemek közül az üldözés követésére**

(n=10/csoport; A  $p < 0,05$  a kezelés/A(K) relációban; kezelés típusai: D1: 0,1  $\mu\text{g}/\text{ts.kg}$ ; D2: 1  $\mu\text{g}/\text{ts.kg}$ )

Az agresszivitás vizsgálatára alkalmas resident-intruder teszt során nyert adatok eredményei szerint a klórbenzol kezelések hatására fokozódott az agresszív hajlam. Mindezt az offenzív magatartási mintázatokat (fenyegető testtartás /14. ábra/ üldözés /15. ábra/) jellemző mérési eredmények szignifikáns fokozódása igazolja.

#### 4.5. Krónikus fizikai expozíciók hatásainak vizsgálata

Szubtoxikus dóziszú, nem célzott szöveti érintettséget jelentő vizsgálatainkban tüdőtumorban involvált betegcsoporton végeztünk standardizált módon vizsgálatokat a sugárterápiás kezelések során. A nyelőcső, mint nem célzott expozíciós terület került itt vizsgálataink fókuszába. Eredményeinkben a nemzetközi tesztvizsgálatok során elfogadott AET súlyossági skála adatait tüntettük fel [110].

AET mérték (n=50)	Betegszám (%)
Grade 0	17 (34%)
Grade 1	16 (32%)
Grade 2	14 (28%)
Grade 3	3 (6%)
Grade 4-5	0

**3. táblázat: Akut nyelőcső toxicitás (AET) mértékének követése tüdőtumороk ionizáló sugárkezelése kapcsán (n=50)**

	Grade 0-1 n=33	Grade 2-3 n= 17	p-value (t-test)
D <sub>max</sub> (Gy)	54,56±11,45	64,07±5,55	<0,001
D <sub>átlag</sub> (Gy)	21,87±8,24	30,98±7,57	<0,001

**4. táblázat: Ionizáló sugárkezelésre kialakult akut nyelőcső toxicitások dozimetriai paraméterei**

(n=50) D<sub>max</sub>: maximális alkalmazott összes sugárdózis (Gy); D<sub>átl</sub>: átlagos alkalmazott sugárdózis (Gy)

A radioterápiás kezelés során - melyet a mesterséges ionizáló sugárhatás környezeti modelljeként használtunk - mellékhatásként észlelhető nyelőcsőgyulladás a betegek 66%-ában alakult ki. 34%-ban nem észleltünk kimutatható hatást. Expozíciós (mellék)hatás Grade 1 és 2 formában 32% és 28%-ban jelent meg, a Grade 3 súlyossági forma 6%-ban volt detektálható (3. és 4. táblázat) [110].

#### **4. 6. Környezeti expozíciók és fiziológiai markerek kapcsolatának vizsgálata**

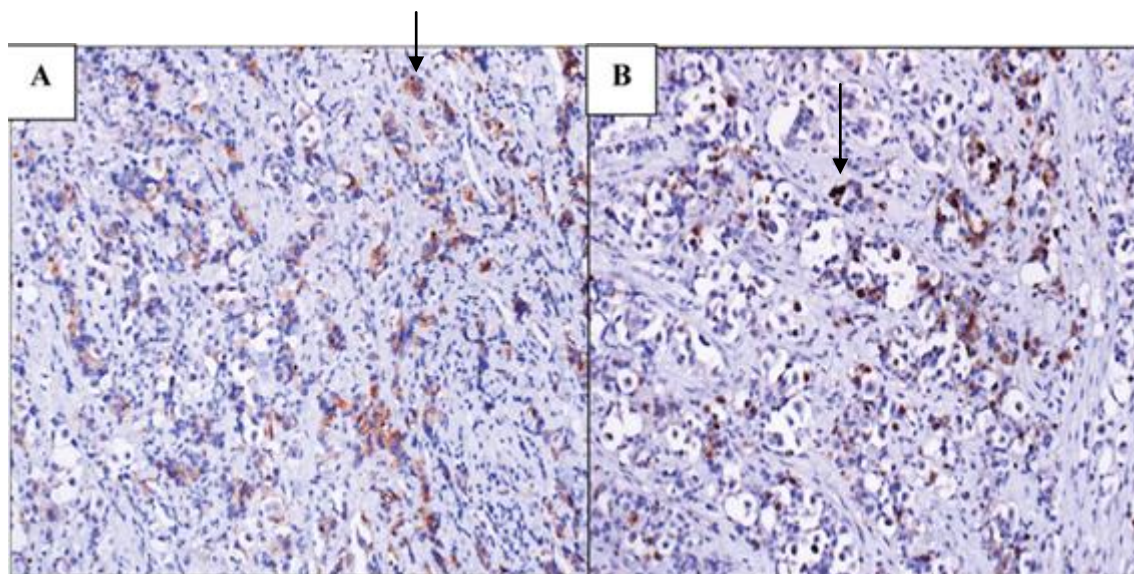
A viselkedési vizsgálatok eredményei szerint a homeosztatisz folyamatok megváltozásai a krónikus expozíciók során (*in vivo* szubtoxikus - kémiai és/vagy fizikai expozíciók) valós elváltozásokat generálhatnak, pl. gyulladások, sejt-transzformációk. Ezek a tumorgenezis szempontjából jelentősek, így indokolt lehet a kapcsolt folyamat-markerek közül a követésre alkalmasak kutatása. Ennek kapcsán vizsgálatainkban tüdőtumoros (adeno- és laphámkarzinómás) betegek esetén kerestük azokat a citológiai markereket, amelyekkel a

betegség előrehaladását (a tumoros és diagnosztikai hatás alkalmasságát) követhetjük. Ennek során olyan immunhisztokémiai generális jeleket kerestünk, amelyek diagnosztikus szempontból biztonságosak, és alkalmasak az előrehaladási stádiumok követésére is (5. táblázat).

Tumoros beteg csoport (n=28)	BCL2			MDR1			BCL2 és MDR1		
	∅	1+	2+/3+	∅	1+	2+/3+	∅ /1+	kevert	2+/3+
expressziós gyakoriság betegszámban	16	6	6	19	3	6	19	6	3
expressziós előfordulás %	57,2	21,4	21,4	67,8	10,7	21,4	67,9	21,4	10,7

#### 5. táblázat A BCL2 és MDR1 expresszió változása tumoros betegcsoportnál

Expresszió besorolás BCL2 vagy MDR1 esetén: **∅**: 0-1% a pozitív sejtszám/felületegység, **1+**: 2-33% közötti +sejt; **2+**: 34-66% közötti +sejt, **3+**: > 67% a +sejtszám, **kevert**: ha a BCL2 vagy az MDR1 közül csak az egyik **∅** vagy +1 [110].



#### 4. kép. Tüdődaganat immunhisztokémiai vizsgálata

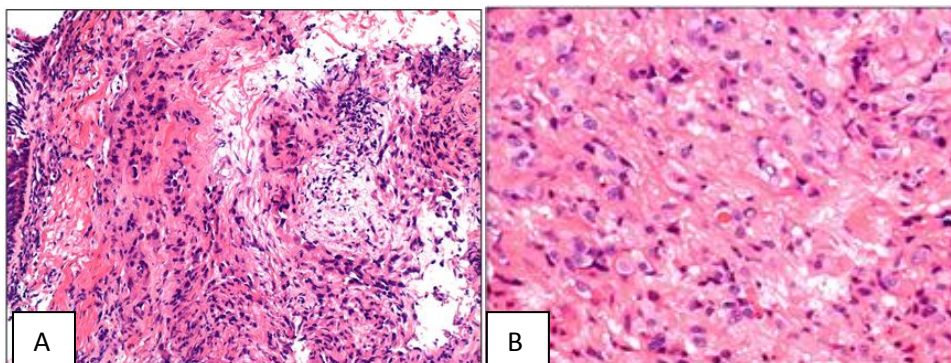
**A:** mérsékelt MDR1 citoplazmatikus pozitivitás (OM: 224x); **B:** mérsékelt sejt és citoplazmatikus BCL2 pozitivitás (OM: 224x)

A statisztikai mintaelemzésnek megfelelő esetszámban vizsgáltuk a tumoros betegek szövetmintáit, a számos citológiai marker közül a BCL2 és az MDR1 expresszió (4. kép) követési lehetőség nagy biztonságúnak (5. táblázat %-os gyakorisági eredményei) mutatkozott [111].

#### 4.7. Dinamikus, terápia-támogató eljárás kidolgozása PEHE kapcsán

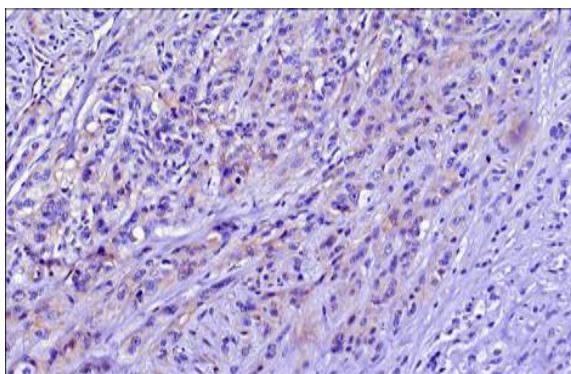
A 10.-15. ábrán feltüntetett eredmények szerint az *in vivo* szubtoxikus dózisu CIB kezelések a viselkedési mintázatokat statisztikailag értékelhetően módosították. Vállalt célkitűzésünknek megfelelően eredményeinket extrapolálni kívántuk humán vonatkozásokra is, ezért PEHE tüdőtümor *in vitro* modellen folytattuk a vizsgálatokat.

Az egyed szinten szubtoxikus dózisu (taxán: TX) kezelések hatását dinamikus folyamatkövetéssel, valamint a nyomjelző markerek kutatásával sejtkultúrákon vizsgálatuk. A vizsgálatainkba bevont PEHE tümor *in vitro* immunhisztokémiai eredménye szerint CD31 3+, Ki67: + (>30%), CD34 és VIII. faktor antigén vesztést mutatott, ösztrogén és progeszteron receptor negativitás mellett, amely az MDR1 protein 2+, és alacsony BCL2 jelenléttel párosult (5. és 6. kép) [89]. Haematoxilin-eozin festéssel jól megfigyelhető subepitheliálisan a differenciálatlan, epitheloid jellegű, vacualizált, enyhe citológiai atípiát mutató tumoros sejtes infiltráció.



5. kép. PEHE tumorszövet haematoxilin-eozin festéssel (A: OM: 10x; B: OM: 40x)

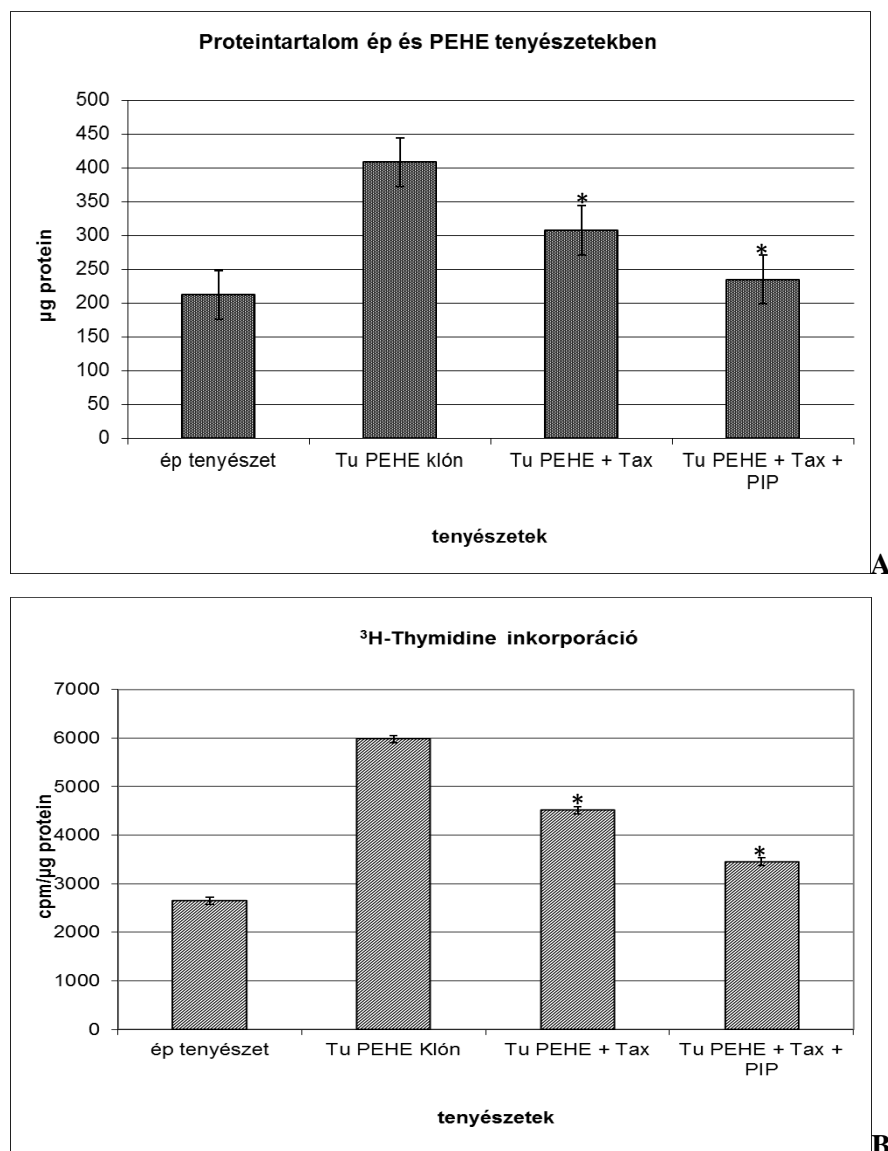
A BCL2 és MDR1 kimutatást, mint folyamat-követési és terápia-meghatározási lehetőséget alkalmaztuk a PEHE szövettani minták vizsgálata során, ahol steril mintavételekből származó *in vitro* monolayer sejtkultúrákon (kontroll: C és tumoros: Tu) tanulmányoztuk - az előzetesen dózis- és időkinetikai paramétereiben standardizált - kísérleti modellünkben a Tax (0,6 ng/ml) és/vagy PIP (promethazine: 2,5 µg/ml) hatását a sejtproliferációs aktivitásra.



6. kép. PEHE tumorszövet immunhisztokémia vizsgálata

(1+/3+ MDR1 pozitivitás igazolt, OM: 20x)

Eredményeink szerint (16. ábra) az egészséges tüdőszövetből (a minták ép területeiből) készült primer, monolayer sejtkultúrák spontán fehérjetartalom és  $^3\text{H}$ -Thymidine inkorporációval jellemezhető osztódási gyakorisága, mint kontroll került elemzéseink során alkalmazásra. A PEHE klónból készült minták esetén ugyanezek a paraméterek szignifikánsan fokozódtak. *In vitro* alkalmazott Tax a PEHE-kultúrák sejtosztódási gyakoriságát szignifikánsan csökkentette (7. kép), amit tovább javított a PIP, mint MDR1 törlő hatású ágens.



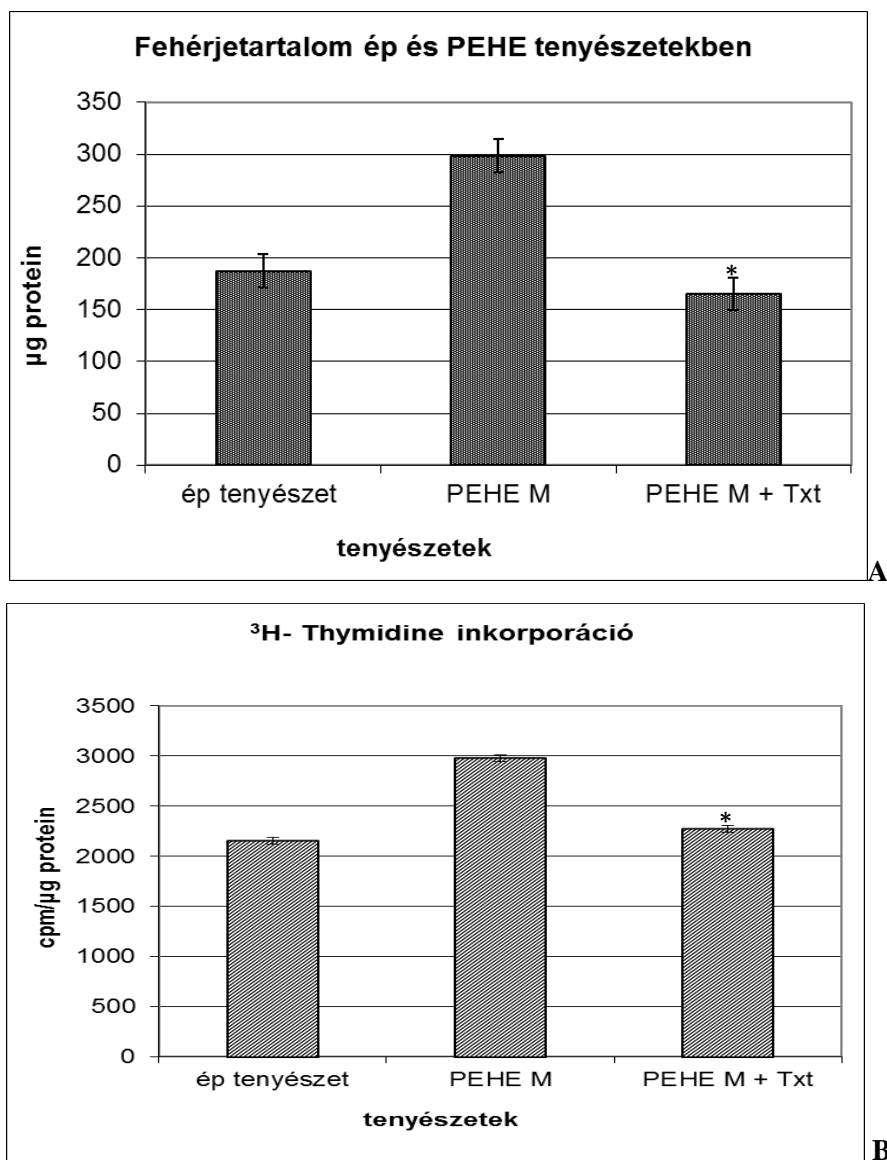
**16. ábra. Taxánok hatása egészséges és PEHE tumoros kultúrák sejtproliferációs aktivitás változásaira *in vitro***

**A:** fehérje produkció és **B:**  $^3\text{H}$ -Thymidine inkorporáció követésével

(n=20, X mean $\pm$ SEM, \*p<0,05)

Ép tenyészet: Kontroll, Tu PEHE Klón: tumoros PEHE Klón kultúra; Tax: paclitaxel 0,6 ng/ml; PIP: 2,4  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Pipolphen (promethazine)

A következőkben (17. ábra) az *in vivo* elsővonalbeli kemoterápiás kezelést követő mintavételből készült *in vitro* PEHE kultúrák sejtproliferációs aktivitását vizsgáltuk a protein produkció detektálásával, valamint a DNS szintézis nyomjelzésre alkalmazott  $^3\text{H}$ -Thymin felvétel meghatározásával.



**17. ábra.** *In vivo* elsővonalbeli kezelés hatása a dinamikus sejtproliferációra *in vitro*

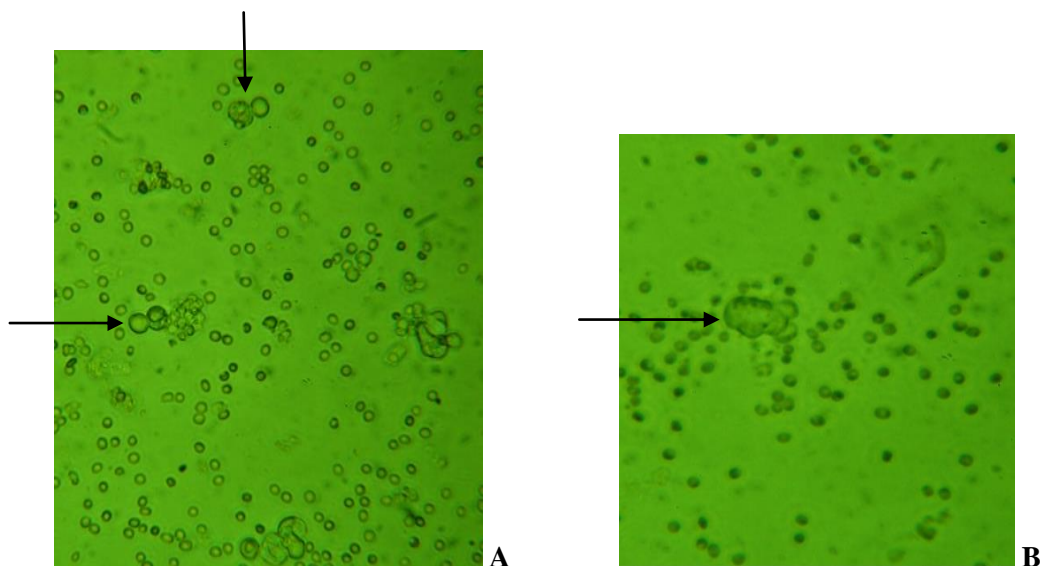
**A:** fehérje produkció és **B:**  $^3\text{H}$ -Thymidine inkorporáció követésével

(n=20, X mean±SEM, \*p<0,05)

Ép tenyészet: Kontroll, PEHE M: kevert kultúra (ép és transzformált sejtek);

Txt: docetaxel  $10^{-6}$  M/ml;

*In vivo* alkalmazott elsővonalbeli kemoterápiás és promethazine (PIP) kombinációs PEHE kezelések hatására a sejtproliferációs gyakoriság (17. ábra) statisztikailag szignifikánsan csökkent az *in vivo* kezeletlen (16. ábra) állapothoz képest. A további *in vitro* Txt kezelésekkel a sejtproliferációt még lehetett csökkenteni (17. ábra), a kezelések után a daganatsejtek nagyfokú apoptózisa volt megfigyelhető, melyet az *in vitro* fenntartás kapcsán észlelhető nagyfokú sejtvesztés is igazolt (7. kép).



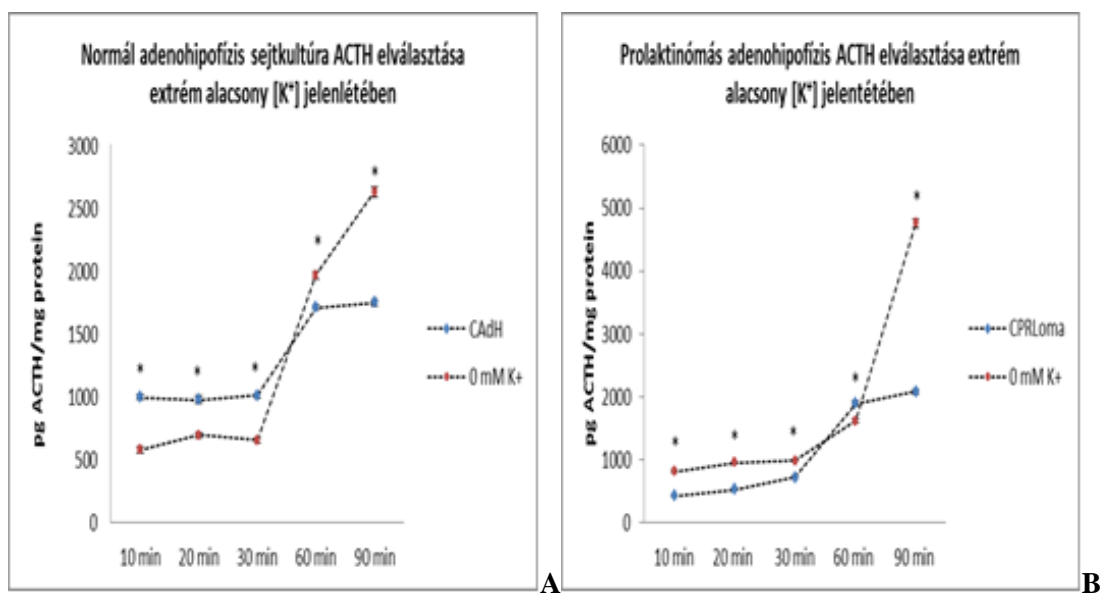
7. kép. Apoptotikus PEHE kultúra (A: OM: 65x, B: OM: 80x)

#### 4.8. Lokális környezeti feltételváltozások hatása a tumorok viselkedésére

A különféle környezetterhelések hatására is kialakuló sejtciklus módosulások követésére alkalmas sejtfiziológiai markerváltozások (BCL2, MDR1) detektálása után a közvetlen sejt-környezet, az extracelluláris ionmilieu változások hatásait tanulmányoztuk. Ennek során két monovalens kation: a kálium és a nátrium extrém alacsony koncentrációinak hatásait vizsgáltuk egészséges és tumoros sejtek exocitotikus aktivitásaira. Egészséges sejt-funkciókat adenohipofízis (Adh) sejt-kultúrákon, a tumoros funkciókat prolaktinómás adenohipofízis (PRLoma) tenyészeteken tanulmányoztuk. A hatáskövetésre az említett modellek hormon-elválasztási tulajdonságait használtuk fel. Ismeretes, hogy PRLoma a szervezet belső endokrin-szabályozási egyensúlyának eltolásával (ösztronacetáttal indukált negatív feed-back szimulációval) is kiváltható, amelyhez hasonló fiziológiai hatásokat környezeti terhelések is okozhatnak (pl. halogénezett szénhidrogének).

A 18. ábrán az extrém alacsony extracelluláris hipokalémia hatását mutatjuk be Adh (A: normál adenohipofízis) és PRLoma (B: prolaktinóma) sejt-tenyészetek ACTH elválasztására a kísérlet 90 perces követési időszávjában.

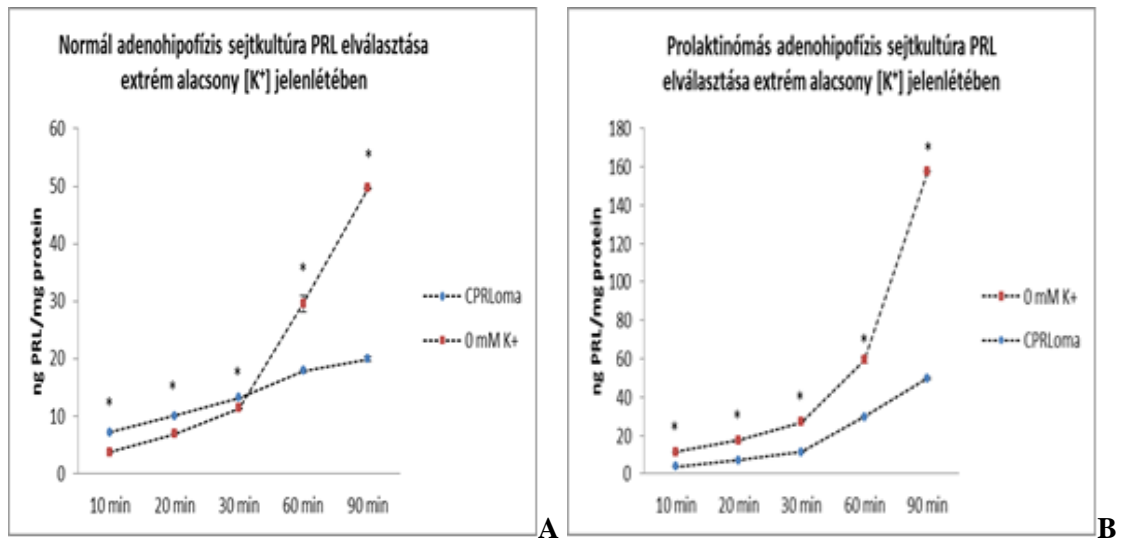




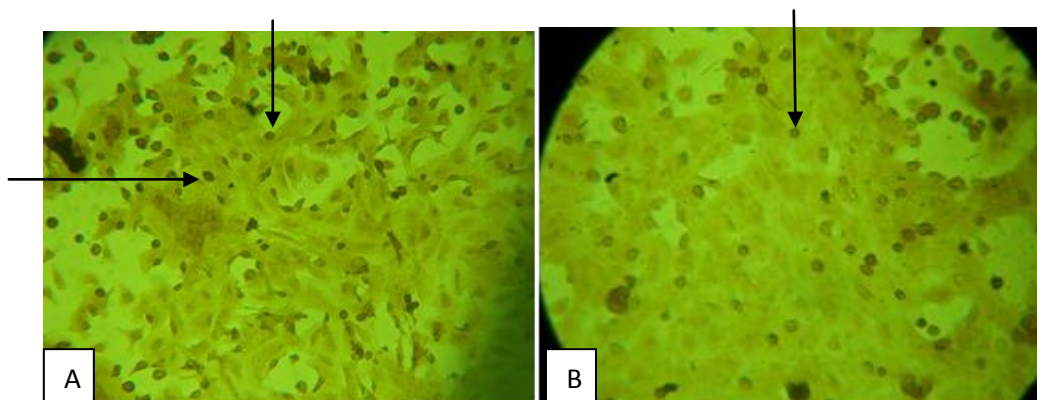
**18. ábra. Extracelluláris hipokalémia hatása az ACTH elválasztásra Adh (A) és PRLoma (B) sejt kultúrákon (n=10, \*p<0,05)**

Látható, hogy az Adh és a PRLoma sejt kultúrák fiziológias körülmények között (komplett Tyrode oldatban: C) is eltérést mutatnak az időfüggésük karakterisztikájában. A hipokalémia hatására ez az eltérés a normál és tumoros kultúrák között hangsúlyosabban jelent meg, miszerint a PRLoma esetén többszörösére fokozódott a dekompenzált hormonelválasztás.

A következő eredményábrán (19. ábra) az extrém alacsony extracelluláris hipokalémia hatását tüntettük fel Adh (A) és PRLoma (B) sejttenyészetek PRL elválasztására 0-90 perces időkinetikai vizsgálatainkban. Látható, hogy a PRL elválasztásban erősen eltérő hormonelválasztásokat detektáltunk a kétféle (egészséges és tumoros) modellen. Ugyanakkor a hipokalémia hatására a PRL release közel kétszörösére fokozódott az Adh esetén, és négyszeres emelkedést mutatott a PRLoma kultúráknál.

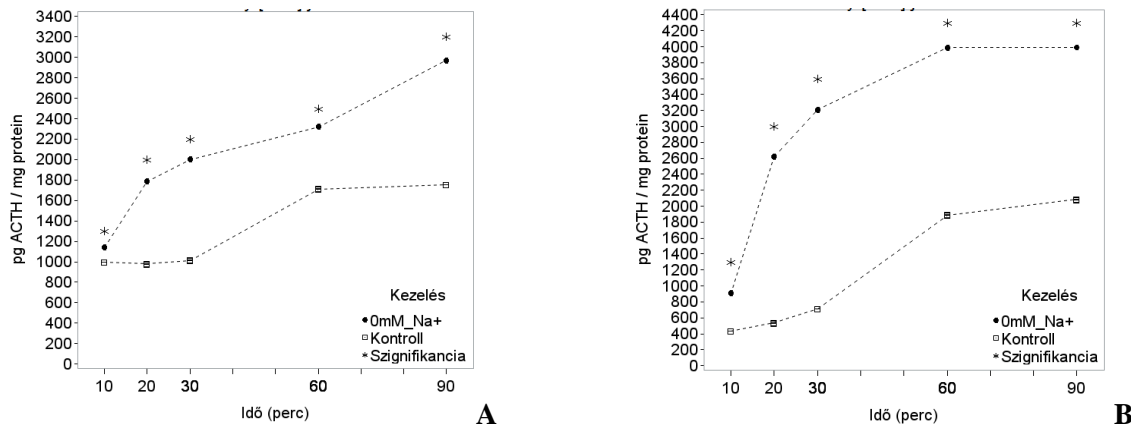


**19. ábra. Extracelluláris hipokalémia hatása a PRL elválasztásra Adh (A) és PRLoma (B) sejt kultúrákon (n=10, \*p<0,05)**



**8. kép. BCL2 protein immunhisztokémiai vizsgálata patkány Adh sejt kultúrákon**  
**A:** Kontroll monolayer sejt kultúra; **B:** hipokalémiás monolayer sejt kultúra 0 mM [K<sup>+</sup>]

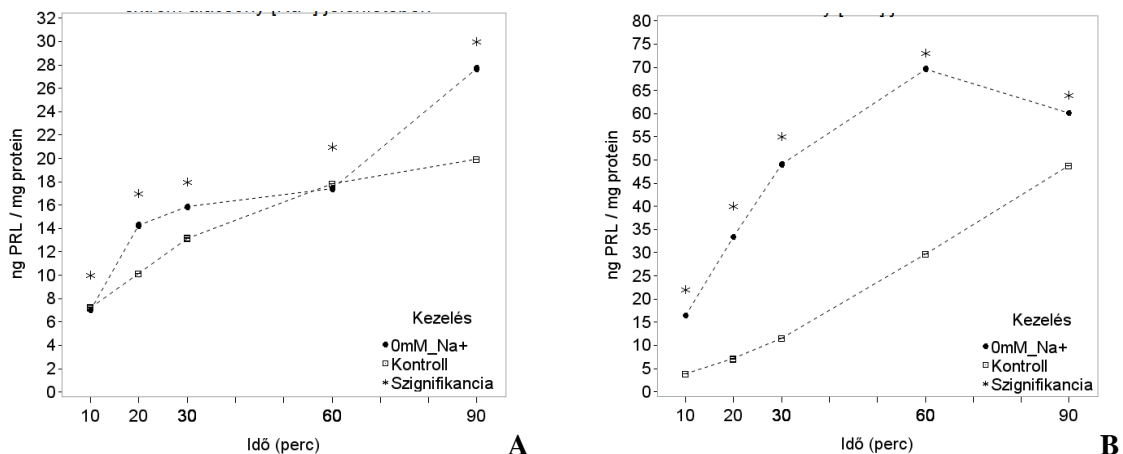
A 8. képen jól látható, hogy apoptotikus folyamatok generálódnak a sejtekben a kiindulási 0 mM [K<sup>+</sup>] jelenlétében, amit a BCL2 tartalom csökkenése jelez (melyet a képen a kevesebb karakterisztikusan festődő sejt mutat).



**20. ábra. Extrém alacsony extracelluláris [Na<sup>+</sup>] koncentráció változás hatása az ACTH elválasztásra**

Adh (A) és PRLoma (B) sejt kultúrákon *in vitro* (n=8, \*p<0,05)

A 20. ábrán az ACTH elválasztás időfüggő alakulását mutatjuk be Adh és PRLoma modelleken extrém alacsony extracelluláris [Na<sup>+</sup>] Tyrode oldat hatására. Látható, hogy a kontrollhoz képest (fiziológiás [Na<sup>+</sup>] Tyrode médiumban) a 0 mM [Na<sup>+</sup>] jelenlétében mindkét sejt típusban statisztikailag szignifikáns eltéréseket detektáltunk, de láthatóan a tumoros sejtek esetén a kompenzáló mechanizmusok akadályozottak a vizsgált sejt funkció tekintetében.



**21. ábra. Extracelluláris hiponatrémia hatása a PRL elválasztásra**

Adh (A) és PRLoma (B) sejt kultúrákon *in vitro* (n=8, \*p<0,05)

A 21. ábra a PRL release időkinetikai eredményeit mutatja be normál és extrém hiponatrémias közegben vizsgált Adh és PRLoma esetén.

A PRLoma esetén tapasztalható többszörösére fokozódó PRL elválasztás időben nem kompenzált kinetikát mutat.

Munkánk fő célkitűzései közé tartozott még, hogy az *in vitro* eredmények *in vivo* rendszerre történő extrapolálását is elvégezzük. Ehhez az alacsony extracelluláris ionkörnyezet tanulmányozásával kívántuk az egészséges és tumoros sejtek viselkedése közötti eltéréseket vizsgálni, keresve az esetleges prediktív lehetőségeket is [132, 133].

Vizsgáltuk 147 kissejtes tüdőkarinómás beteg esetében az extracelluláris tér monovalens  $K^+/Na^+$  ioneltolódását (2010. január 01.-2014. július 01. között, SZTE Tüdőgyógyászati Tanszéken).

Az 6. táblázatban kissejtes tüdőkarinómában szenvedő betegek diagnózis felállításakor és a betegség progressziója során észlelt szérumszintű  $[Na^+]$  értékét tüntettük fel. Összességében a betegek 41,5 %-ában (61 beteg) észleltünk alacsony nátriumszintet. Egy részüknél (26 beteg) már a diagnózis felállításakor, míg 35 betegnél csak a betegség későbbi szakaszában, általában recidíva vagy jelentős progresszió kapcsán jelentkezett hiponatrémia (6. táblázat).

n=147	<b>szérumszint normál <math>[Na^+]</math></b>	<b>szérumszint hypo <math>[Na^+]</math></b>
diagnózis felállításakor (fő)	121	26
progresszió során (fő)	86	35

**6. táblázat. Normál és alacsony extracelluláris  $[Na^+]$  érték előfordulása kissejtes tüdőkarinóma esetén**

(n=147, szérumszint normál  $[Na^+]$  érték: 136-145 mmol/l)

A 7. táblázatban mutatjuk be a prediktív lehetőségeket megalapozó normál és alacsony szérumszintű  $[Na^+]$  értékkel bíró betegek túlélési adatait.

	<b>szérumszint normál <math>[Na^+]</math></b>	<b>szérumszint hypo <math>[Na^+]</math> diagnózis felállításakor</b>	<b>szérumszint hypo <math>[Na^+]</math> progresszió során</b>
betegszám	58	26	26
átlagos túlélés (hónap)	6,9	4,6	7,2
p (Dunett t)		0,078	0,883
p (ANOVA)		(0,068)	(0,399)

**7. táblázat. Kissejtes tüdőkarinómás betegek túlélési adatai a szérumszintű  $[Na^+]$  érték függvényében**

(n=110)

A diagnózis felállításakor észlelt hiponatrémia esetén az átlagos túlélés lényegesen alacsonyabb volt, mint a normál nátrium szintű betegek esetében (4,6 vs 6,9 hónap), bár a különbség nem bizonyult statisztikailag szignifikánsnak ( $p=0,078$ ). Nem a kiinduláskor, hanem később kialakult alacsony nátriumszint esetében nem észleltünk túlélési különbséget a normál nátriumszinttel bíró csoporttal összehasonlítva (7,2 vs 6,9 hónap).

A 8. táblázatban került feltüntetésre kissejtes tüdőkarinómában az extracelluláris  $[Na^+]$  érték csökkenése és a túlélés kapcsolatának vizsgálata. Hiponatrémia esetén összefüggést találtunk a túlélési paraméterekben a betegség kiterjedése szerint (a mellkasra lokalizálódó, ún. korlátozott kiterjedésű: „limited disease” LD (8. A) és a kiterjedt betegség: „extensive disease” ED (8. B).

”limited disease” (mellkasra lokalizált betegség)	<b>szérum normál <math>[Na^+]</math></b>	<b>szérum hypo<math>[Na^+]</math></b>
betegszám	15	10
átlagos túlélés (hónap)	8,8	6,1
p érték (ANOVA)		0,399

**A**

„extensive disease” (kiterjedt betegség)	<b>szérum normál <math>[Na^+]</math></b>	<b>szérum hypo<math>[Na^+]</math></b>
betegszám	43	16
átlagos túlélés (hónap)	6,2	3,2
p érték (ANOVA)		0,032*

**B**

**8. táblázat. Az extracelluláris  $[Na^+]$  szint hatása kissejtes tüdőkarinómás betegek túlélésére (hónapokban, n=84)**

Eredményeink szerint az extracelluláris  $[Na^+]$  csökkenés a tüdőkarinómás betegek túlélésében erős kockázati tényezőként jelenik.

## 5. Megbeszélés

A homeosztázis feladata az élő organizmusokban a belső környezet állandóságának biztosítása, a harmonizált biológiai algoritmusrendszer fenntartása, amelynek feltétele az a környezettartomány, amelyen belül az adott élő képes megvalósítani életfolyamatainak irányítását [1, 2]. A homeosztatikus folyamathálózatban egy permanens iterálás zajlik az élő rendszerek különböző szerveződési szintjein, ahol az irányított rendszerelemek (pl. szervrendszerek, szervek, szövetek, sejtek, sejtközötti terek) komplex működésűek [3].

Az iteráló folyamatok a feltételváltozások követését, azaz a környezetváltozások folyamateredmény szempontú megvalósítási sokaságának egyszerre való megjelenítését képviselik. *Az eredményes folyamatképesség, amellyel az élő egyedek (pl. ember) a környezetük változásaihoz képesek alkalmazkodni az adott élő organizmus környezeti alkalmazkodási potenciáljaként értelmezhető folyamathálózat.*

A környezeti alkalmazkodási potenciál széles spektrumú, amikor is az élő organizmus ugyanazt az eredményt (pl. izotermia) több folyamattal is képes egyszerre fenntartani. Amennyiben ezek bármelyike sérül, még mindig marad(nak) olyan kompenzációs rendszerelem(ek), amellyel az adott szervezet a környezetváltozások okán igényelt homeosztázisát biztosíthatja [3,4].

Természetes, hogy az élő szervezetek alkalmazkodási potenciáljuk spektrum szélességéből veszítenek amikor az alkalmazkodásra irányuló kompenzációs folyamathálózataik működése sérül, vagy az élő rendszerben (pl. öregedés [36, 37]) és/vagy annak környezetében (környezetterhelések [5, 6, 7]) változások jelennek meg. Az említett változások lehetnek erőteljesek [32] és/vagy egyszerre több helyen kialakulók [33], amelyek következtében az alkalmazkodási kapacitás az adott organizmus esetében csökken, esetleg egy kritikus küszöbértéket is elér [4], ami következményesen a rendszer viselkedésének és/vagy állapotciklusának megváltozását indukálja. Humán vonatkozásban a környezeti alkalmazkodási potenciál megváltozásának jó példája lehet a tumoros betegségek megjelenése.

Jelen munkában a különféle környezeti expozíciók (fizika, kémiai) egzakt vizsgálatait organizmus és egyed alatti szinten kívántuk tanulmányozni olyan módon, hogy ehhez alkalmas standardizált modellrendszereket is terveztünk és működtettünk. Egyik távolabbi kutatási célunk - a vizsgálati protokollok megvalósítása során kialakult tapasztalatok segítségével - az adott expozíciók tanulmányozására megfelelő biomonitoring rendszerelemek kialakítása. Jelen Ph.D. dolgozatban bemutatott módszerek tehát ebben a kontextusban is érintettek, amit igazol pl. az expozíciós útvonalak (pl. táplálkozási, parenterális) beállítása is.

Törekedtünk arra, hogy a valós állapotokat szimuláló expozíciós események vizsgálata során kialakuló rendszerdinamikai változások (pl. egészséges - majd a még nem detektálható, csak trend jellegű változásokkal járó - gyulladós, és ennek több súlyossági stádiuma - tumoros) követésére alkalmas modelleket tervezzünk, építsünk ki és standardizáljunk, amint azt az 1. és 2. célkitűzési pontokban a dolgozat 2. fejezetében fogalmaztuk meg. Természetesen a környezetterhelések követésére való alkalmasságot az expozíció típusok (fizikai: mesterséges ionizáló sugárzások; kémiai: természetes szintetizátumok: TX, xenobiotikumok: CIB), a kutatási protokollban használható idő- és dóziskinetikai paraméterek meghatározásával (kutatási metodika kialakítása: 3. fejezet: sejt kultúra vizsgálatok, proliferációs aktivitás követése, hisztológiai vizsgálatok), valamint a nemzetközi szakirodalom eredményei alapján [90, 91, 132, 136, 138] biztosítottuk. Fontos vizsgálati kritériumnak tekintettük, hogy olyan dózissal történő kutatási módszereket alakítsunk ki standardizáltan, amelyekkel szubtoxikus (4. fejezet: 2. táblázat, 9. ábra) dózistartományokban észlelhető változásokat is követhetünk. Ismert, hogy az ökotoxikológia tárgykörébe tartozó kutatási adatok, valamint a társadalmi szinten ezekre megjelenő reakciók a jelzett tartományokkal nem igazán foglalkoznak. Ugyanakkor a hosszú élettartamú élőrendszerek esetében a permanens, extrém és/vagy igen alacsony dózissal történő expozíciók hatása nem elhanyagolható.

A szubtoxikus dózissal történő környezeti hatások tanulmányozására *in vitro* (sejt kultúrák - 4. fejezet 1.-3. kép) és *in vivo* rendszereket alakítottunk ki (3. fejezet: viselkedés vizsgálatok - open-field, resident-intruder teszt). Különös figyelmet igényelt a humán vizsgálatoknál a betegcsoportok olyan módon való kiválasztása, hogy az a statisztikai szempontú mintaelemzési követelményeknek megfeleljen.

Az egyedszintű EDC hatású, de igazoltan szubtoxikus koncentrációban alkalmazott CIB pszicho-neuro-endokrinrendszerre gyakorolt hatásainak tanulmányozására (3. cél) viselkedés vizsgálatokat végeztünk (3. fejezet - open-field teszt, resident-intruder teszt). Munkánk során különösen fontosnak tartottuk az olyan kontroll rendszer (3.1. fejezet) kialakítását, amelyben nagy esetszámban és minden, a kezelések kapcsán érvényesülő, de nem az expozítor által kiváltott hatás követése biztosított. A különféle kontrollcsoportok közötti eltéréseket keresve statisztikai elemzéseket végeztünk (3. fejezet - ANOVA, kétutas analízis). Megállapíthattuk, hogy nincsenek sem statisztikailag szignifikáns, sem trend jellegű eltérések a kontroll csoportok között, így a további eredmény-interpretálásnál már nem az összes kontrollcsoport paramétereit, csak az abszolút kontroll /A(K)/ eredményét tüntettük fel.

A CIB expozíciók által kiváltott viselkedés-mintázati eltéréseket prezentáló eredményeinket igen sok szempont szerint rögzítettük (pl. lokomotoros aktivitás: mozgással megtett út, mozgási sebességváltozás; a felfedező aktivitás, a freezing) annak érdekében, hogy a levont

következtetések megbízhatóak legyenek. Ugyanis a viselkedési mintázatok megjelenései (a különféle expozíciók kapcsán) igen széles kifejeződési formát mutathatnak [10]. Így ugyanazt az eredményt (pl. szorongás) többféle viselkedésminta prezentálásán keresztül is képes egy élő organizmus közvetíteni. Ezért vizsgálataink során számos viselkedéselemet követtünk (open-field teszt, resident-intruder teszt, elevated-plus maze teszt), melyek közül csak néhányat tüntettünk fel a dolgozatban. A vizsgált viselkedéselemek által közvetített eltérések jellege megegyező volt (4. fejezet: 10.-15. ábra). Megállapítható volt, hogy a szubtoxikus dózisú (0,1 és 1,0  $\mu\text{g}/\text{ts.kg}$ ), krónikus CIB kezelés hatására mind a szorongással, mind az agresszióval összefüggésbe hozható viselkedéselemek kifejeződése erősödtek. A 90 napos kezelést követően már minden viselkedésem szignifikáns eltérést mutatott mindkét dózisban. Azonban az alacsonyabb dózisú expozíciók hatása a 60 napos kezelési periódusban még nem prezentálta minden vizsgált viselkedésmintázatban a vázolt eltérést. Ez az eredmény azt sugallja, hogy 0,1  $\mu\text{g}/\text{ts.kg}$  expozíciós CIB dózis alkalmazása esetén már közelítünk a hatásküszöbhez az agresszív viselkedésem követése tekintetében.

A vizsgált CIB dózisok a *környezeti alkalmazkodási potenciál* tekintetében tehát a bemutatott viselkedésvizsgálatok szerint értékelhető változást jelenítettek meg.

Így megállapítható, hogy az alkalmazott, igazoltan szubtoxikus dózisú CIB kiválthat olyan, a források megszerzésére irányuló hátrányos magatartásmintázatot [11, 12, 13], ami tovább erősítheti a még strukturálisan (biológiai organizmus szervezeti rendszerében) nem fixálódott CIB okozta hatáseltéréseket. További fontos megállapításunk, hogy a CIB expozíciók révén kapott eredmények a halogénezett szénhidrogének hatásaival kapcsolatban hozott társadalmi intézkedések átgondolását is indokolják. Ugyanis a megengedett használható dózistartományok alatt volt nagyságrendekkel az általunk vizsgált szubtoxikus dózis (felszín alatti vizekben: triklórbenzol: 0,001  $\mu\text{g}/\text{l}$ , hexaklórbenzol: 0,01  $\mu\text{g}/\text{l}$ , földtani közegben: halogénezett aromás szénhidrogének: 0,001  $\mu\text{g}/\text{l}$  Kémiai Egyesületek Nemzetközi Tanácsa (ICCA) 7/97-es irányelvében foglaltak szerint [142]), mégis a kezeletlen csoportoktól eltérő hatáseredményeket detektáltunk. A vázolt következmények oki tényezőjeként a krónikus kezelési protokollt is tekinthetjük, ugyanis a halogénezett szénhidrogén modellvegyületek perzisztens [47] és deponálódó [6] tulajdonságúak.

Az EDC csoportba tartozó szubtoxikus dózisú CIB ágensek krónikus expozícióinak vizsgálata során igazoltuk azok viselkedési elemeket megváltoztató hatásait.

A következőkben 4. célkitűzésünknek megfelelően a fizikai expozíciók hatásainak tanulmányozását mutattuk be eredményeinkben (3.-4. táblázat) azzal a céllal, hogy a rendszerszinten detektálható eltérések észlelését standardizált módon tudjuk követni. Amikor a mesterséges ionizáló sugárzást a sugárterápia során igazoltan standardizált és rögzített



körülmények között alkalmazzák, akkor annak apoptózist indukáló hatása csak a célterületen érvényes. Viszont a sugárzásnak olyan, nem célzott területeken is jelentkezik a hatása, amelyet terápiásan nem céloznak. Ilyenkor egy ismert szubtoxikus dózisu ionizáló sugárhatással kell számolnunk. Igazoltuk, hogy a tüdőkarcinómák célzott sugárkezelése kapcsán a nem célzott nyelőcső területen kialakuló hatások követése biztosított [110], a gyulladós folyamatok kiváltásának bizonyítása mellett annak progresszióját is bemutattuk. Megállapítottuk, hogy a nyelőcső sugárhatással kiváltott elváltozásai és a dózis-volumen paraméterek között összefüggés van. A 45Gy feletti dózis hajlamosít a súlyosabb (Grade 2 és 3) gyulladások kialakulására (4. fejezet: 3.-4. táblázat).

Amennyiben egy tartós környezeti hatás (fizikai és/vagy kémiai) kiváltotta strukturális biológiai rendszerváltozást (pl. gyulladás) igazolunk, fontos kérdéskör, hogy annak progressziója szempontjából milyen jelentős markereket érdemes vizsgálnunk. A krónikus gyulladós folyamatok előrehaladt állapotban sokszor alakulnak tumorrá, ami már a teljes rendszerviselkedés átalakulását jelenti. Ebben a vonatkozásban már a különféle környezeti expozíciók hatására fixálódott biológiai ciklusrendszer strukturális változásai (humán tumoros betegségek) jelentek meg. Munkánk során kerestük azokat a genomiális markereket, amelyekkel a vázolt igen hosszú struktúra, majd rendszerciklus változási folyamat követhető. A BCL2 és MDR1 expresszió mennyiségi követése (természetesen egyéb markerekkel együtt, amelyek jelenlegi vizsgálatainknak is tárgyai), lehetőséget nyújt a strukturális zavarok és az állapotciklusok változásainak tanulmányozására (5. táblázat; 4. kép).

Kitűzött kutatási céljaink szerint (5. cél) a dolgozatban már igazoltan kiválasztott MDR1 és BCL2 általános követési paraméterek mellett a terápiát is segítő egyéb specifikus markereket is meghatároztunk. A PEHE tumor *in vitro* immunhisztokémiai vizsgálatában eredményeink szerint a CD31: 3+, Ki67: + (>30%), CD34 és VIII. faktor antigén vesztést észleltünk, ami ösztrogén és progeszteron receptor negativitással, valamint az MDR1 protein 2+ aktivitással, és alacsony BCL2 jelenléttel párosult. Ennek ismeretében *in vitro* modelleken végzett különféle tumorkezelési terápiában alkalmazott ágensek hatásait tanulmányoztuk (pl. vinorelbine: C<sub>45</sub>H<sub>54</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub> CAS N: 71486-22-1; carboplatin: C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>Pt, CAS n:41575-94-4; docetaxel: C<sub>43</sub>H<sub>53</sub>NO<sub>13</sub>, CAS N:114977-28-5; paclitaxel: C<sub>47</sub>H<sub>51</sub>NO<sub>14</sub>, CAS N:33069-62-4) a hatékonyabb terápia érdekében. Az alkalmazott *in vitro* modellvizsgálat lehetőséget biztosított a tartós, több generációs sejt kultúrákon zajló dinamikus sejtviselkedések tanulmányozására. Így az MDR1 adott ágens (gyógyszer) szerinti specifitásának megjelenését és/vagy erősödését plazmidtörelő anyagok kombinációban történő alkalmazásával vizsgálhattuk. Ehhez, a korábbi kutatásainkból ismert [30, 31] promethazint is bevontuk vizsgálatainkba, amely az antihisztaminként ismert Pipolphen nevű gyógyszer hatóanyaga. Eredményeink szerint

promethazinnal még hatékonyabban sikerült a PEHE kultúrák - általunk kiválasztott taxán (paclitaxel) jelenlétében - szignifikánsan csökkent sejtproliferációját visszaszorítani (16. ábra). A terápiás kezelési sémát tehát ennek megfelelően lehetett kialakítani, amit igazolt annak sikeressége. Az *in vivo* terápia hatását is követtük újabb mintavételekből származó modellek kialakításával. Ebben a vizsgálati protokollban dinamikus elemzésre nyílt lehetőség az *in vivo* előkezelt sejtek viselkedésének követésében. A terápia sikerének megítélése és a további kezelések kialakításához is ebben a kutatási lépésben végeztük el a vizsgálatokat. A promethazin MDR1-t gátló hatása igazolódott, hiszen *in vitro* továbbkezelés TXT jelenlétében szignifikánsan csökkentette a sejtproliferációt. Az *in vivo* zajló tumoros állapotok követésére és a terápiás célzottság tekintetében hatékonyabb beavatkozások kialakítására jelen vizsgálatok szerint a dinamikus *in vitro* modellek alkalmazása megfelelőnek bizonyult. A terápiás gyakorlatban jelenleg a statikus vizsgálatok (egyszeri beavatkozásból nyert mintákból hisztológiai vizsgálata, képpalkotó eljárások stb.) kerülnek alkalmazásra, melyek egy-egy adott állapotban rögzítik a tumoros betegség jellemzőit, de nem teszik lehetővé a rendszerfolyamatok aktuális követését. Amennyiben a *környezeti alkalmazkodási potenciál spektrumának szűküléseként értelmezzük a tumoros folyamatokat*, úgy azok viselkedését a meghatározó markerekkel és a folyamatok követésével lenne érdemes tanulmányozni. Ha *in vitro* modellekben gondolkodunk, ott a környezeti feltételeket jól rögzíthetjük, amelyekkel az esetleges remissziók (vagy gyógyulások) után is támogathatjuk az illető beteget (biológiai rendszert).

Jelen dolgozatban *a környezet*, mint feltétel, és az ezen értelmezett *rendszer dinamikus együttműködésének igazolását* a rendszer állapotciklus-elemeinek módosulásaival követtük. Változást kiváltó tényezőként fizikai, kémiai expozíciót használtunk, amelyekkel az állapotciklusban kis zavarokat (gyulladásokat) idéztünk elő, melyek permanens jelenléte kapcsán strukturális zavarokat is detektálhattunk (4.1., 4.2. fejezet). Természetesen a strukturális zavarok (pl. krónikus kémiai expozíciók által kiváltottak) az adott állapotciklus szempontjából az érintett szerveződési szintek szerint reverzibilisek (tumoros beteg esetében egyed szinten) vagy irreverzibilisek (cikluselhagyást okozva sejtszinten) lehetnek. Mivel az orvostudomány adatbázisa ebben a kérdéskörben igen jelentős, ennek a felhasználása és bővítése is indokoltá tette vizsgálatainkba betegcsoportok bevonását is. Ugyanakkor társadalmi szempontból sem lényegtelen, hogy eredményeink közvetlen hasznosulhatnak az egészségügyi ellátásban. Így a dolgozat egyik jelentős eredményének tekintjük ezt a dinamikus, terápia megalapozó diagnosztikus módszert.

Az egészségügyi ellátás terápiás protokolljainak a hatékonyság fokozása mellett az adott betegségek (pl. kissejtes tüdőcarcinóma) prognózisának pontosabb megismerése is célunk

volt. Irodalmi adatokból ismert [131], hogy környezeti kémiai terhelések hatására extracelluláris ionmilió módosulást lehet kiváltani az élő rendszerekben. Kutatási adataink igazolták (18.-21. ábra), hogy az extracelluláris hiponatrémia vagy hipokalémia megváltoztatja az egészséges és tumoros sejtek hormon release aktivitását. Azt is bizonyította a vizsgálatunk, hogy a normál és tumoros sejtek hormonelválasztási kinetikája (0-90 perc) eltérő karakterisztikákat mutat, melyekben a dekompenzáltóság minden esetben a tumoros sejt kultúráknál volt kifejezettebb. A sejt, mint rendszer és környezete, mint a rendszer feltétele, azaz vonzási tartománya, együttesen határozza meg azt az aktuális mintázatot, amivel a sejt élő komplexitását fenntartja [1, 2]. A megváltozott állapotciklust mutató sejtek tumoros struktúrát (8. kép) és folyamatrendszerrel mutatnak. Ebből az állapotból jelen vizsgálataink szerint nem billenthetők vissza eredeti állapotciklusukba, csak egy új, az élettelenséget képviselő formába, amit apoptózis indukálással (TX ágensek) valósíthatunk meg. Az extracelluláris ionmilió diszkrét eltolódása tumoros sejt esetén az állapotciklus stádiumainak meghatározásához nyújthat segítséget (18.-21. ábra), ami terápiás szempontból lehet jelentős. Az *in vitro* elvégzett kutatási protokollok, melyek a sejtek lokális környezete és a sejt funkciók közötti kapcsolatokat vizsgálta, szoros összefüggéseket tapasztaltunk. Ezt az összefüggést ismerve kerestük tumoros betegnél a hiponatrémia megjelenését, amit igazoltunk is (6.-7. táblázat). Továbbá vizsgálatainkba bevont tumoros beteganyagban bizonyítottuk a hiponatrémia, mint túlélési prediktív marker szerepét (8. táblázat). Eredményeink szerint az ionmilió további konzekvens vizsgálata tehát indokolt a tumoros betegségekben.

A dolgozatban kitűzött célunk volt a környezeti alkalmazkodási potenciál vizsgálata, mely fogalmat jelen dolgozat keretében vezettük be azért, hogy a rendszer és vonzási tartománya (élő anyagmintázat és feltétel-környezete) egységként kezelten kerülhessen tanulmányozásra. Ebben a kontextusban meghatároztuk, hogy a küszöbhatással jellemezhető rendszer és környezete közötti kapcsolat változásai a rendszeren belül eleinte elhanyagolható, majd egyre erősödő folyamat-eltolódásokat okoznak. Történik ez éppen azért, mert a rendszer így alkalmazkodik belső egyensúlyát iteráló módon a környezete változásaira. Amennyiben egy erősen küszöb alatti expozícióval hatunk a rendszerre, úgy az a hatás jelenlétének időtartamától függően válaszol, eleinte kis zavarokkal, melyek lehetnek reverzibilis és irreverzibilis jellegűek. Az expozíció alacsony dózisa esetén is - annak permanens jelenlétekor - egész folyamatkaszád eltolódás indulhat meg, amelyek az adott rendszer állapotciklusának fennmaradását veszélyeztetik a megelőző strukturális zavarok kialakulása után. Amennyiben az indukált állapotciklus váltás lokalizált (elszigetelt sejt vagy szöveti szintű tumorok), úgy az a teljes rendszer (organizmus) léte szempontjából még kezelhető.

Azonban, ha a rendszerben két úton, egyrészt diffúz módon szétterjedt állapotciklus változások igazoltak, vagy másrészt egy-egy esszenciális funkció hordozását akadályozóan szétterjedt állapotciklusból való kiesés jelenik meg, úgy az a teljes rendszer létét veszélyezteti, ami az organizmus életciklusát szüntetheti meg [3, 4].

Jelen munkában konkrét esetekben, adott környezeti expozíciók (ionizáló sugárzások: 3.-4. táblázat, CIB és TX kezelések) hatására kívántuk az adott állapotciklusok azonosítása mellett a jelzett expozítorok hatásait követni, a környezeti alkalmazkodási potenciálvesztés folyamatában. Ebben a vonatkozásban az egészséges állapotciklust minél szélesebb spektrumban prezentálni képes rendszer (pl. sejt, szövet, egyed) volt az általunk fejlesztett módszereknél a kontroll. Ennek az általunk standardizált vizsgálati rendszernek ismeretében (*in vitro* és *in vivo* modellek és kezelési sémák) kívántuk a környezet és /vagy rendszer változásait azonosítani, megkeresve azokat az általános jeleket, amelyekkel a vizsgálni kívánt folyamat követése biztosítható. Így meghatároztunk egy kontroll rendszertől eltérő új állapotciklust a tumorok azonosításakor (elsősorban tüdőtumorok esetén), valamint azokat a jeleket (BCL2, MDR1, apoptotikus események stb.), amellyel ez az állapotciklus követhető. A tumorok viselkedésének megismeréséhez, mivel ez sejtszinten biztosan egy új attraktor, új, dinamikus, a terápia hatékonyságának fokozására is alkalmas módszert dolgoztunk ki (diagnosztizált tumor primer kultúra előállítás). Megállapítottuk, hogy az általunk *in vitro* tenyészetekben vizsgált tumorok eredeti állapotciklusukba nem fordíthatók vissza, ezért élettelen tartományba (másik anyagi állapotciklusba) történő átbillentésükre törekedtünk (TX és PIP alkalmazások). A biológiai rendszerek környezeti alkalmazkodási potenciálja nemcsak közvetlenül (kontakt-expozíció), hanem közvetetten (homeosztatiszikus elemek módosítása) is megvalósulhat. Ilyen következmény pl. az izoiónia eltolódás. Ez környezetváltozás során tapasztalható újabb hatások generálását jelenti, ami egyértelműen igazolja az adott állapotciklust mutató biológiai rendszer és vonzási tartománya (azaz életfeltétele) közötti elválaszthatatlan egységet. *In vitro* kutatási protokollunkban a monovalens kationok ( $\text{Na}^+$  és  $\text{K}^+$ ) vonatkozásában kétféle állapotciklusban (egészséges kontroll és ugyanazon sejtípus tumoros megjelenésében) tanulmányoztuk azok sejtfiziológiai viselkedését. Megállapítottuk, hogy a vizsgált összes funkcióban a tumoros attraktorban lévő modelljeink dekompenzáltak voltak, azaz környezeti alkalmazkodási potenciáljukban gyengék. Az *in vitro* eredmények hipotézisünk szerint csak a környezeti vonatkozások oldaláról közelítve extrapolálhatók a humán terápiás eseményekre. Ennek megfelelően a tumoros betegek extracellulárisan eltolódott monovalens ionjait tanulmányozva megtaláltuk a dekompenzációra utaló jeleket, melyek az áthatolhatatlansági gátak (elszigetelt), és szétterjedt tumoroknál a túlélési lehetőségekkel voltak összefüggésben.

## Új eredmények

1. A környezet alkalmazkodási potenciál meghatározását képviselő rendszerösszefüggések tanulmányozására alkalmas modellrendszerek kerültek kialakítása.
2. Szubtoxikus dózisu kémiai környezeti ágens (CIB) viselkedési elemek (szorongás, agresszió) zavarát kiváltó hatása igazolást nyert. Ennek a *környezeti alkalmazkodási potenciál* szempontjából meghatározható jelentőségét bemutattuk (10.-15. ábra).
3. Fizikai (mesterséges ionizáló sugárzás terápiás dózisban: 45-71 Gy) expozíciók által kiváltott kis zavarok követési módszere kialakításra került koherensen a strukturális zavar markereivel /BCL2, MDR1/ (3.-4. táblázat, 4., 6. kép).
4. Két, eltérő állapotciklus követésére alkalmas dinamikus diagnosztikus és terápia megalapozó módszer került kialakításra a PEHE kapcsán (16.-17. ábra, 7. kép) munkánkban. Ebben a megváltozott állapotciklust mutató tumor-sejtek viselkedését a nyomjelző faktorok szempontjából (pl. az MDR1 tekintetében is) a tumor-progresszióra vonatkoztatva igazoltuk.
5. A tumoros és egészséges sejtek sejtciklusai (attraktorai; Adh és PRLoma) a környezetük, vagy feltételeik (vonzási tartomány) módosulásai (extracelluláris ionkoncentrációk csökkenése) révén komplexitásukban mutattak igazoltan eltérést. Ezek a tumoros kultúrák sejtjeinél dekompenzált karakterisztikákat jelenítettek meg mind az ACTH, mind a PRL elválasztásban (18-21. ábra).
6. Az Adh és PRLoma attraktorok modelljeinek tanulmányozásával nyert eredmények extrapolálásra kerültek humán esetekre. Igazolttá vált rendszerbiológiai megközelítés szerint hipotézisünk, miszerint a vonzási tartomány szerinti extrapoláció megengedett humán vonatkozásokra a jelen ismereteink birtokában (6.-7. táblázat). Így az elszigetelt és kisméretű rendszerelem-változások (sejt)hatásait az egyre magasabb szinten szervezett élő-anyag képes kompenzálni, harmonizálni. A szétterjedt és nagyméretű dekompenzáltág esetén akár teljes rendszerzavar következik be (18.-21. ábra, 8. táblázat).

A munkát támogatta:

TÁMOP4.1.1.C-12/1/KONV-2012-0012 és TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0035.

## 6. Köszönetnyilvánítás

Szeretném kifejezni köszönetemet témavezetőimnek, Dr. Gálfi Márta habilitált főiskolai tanárnak és Dr. Somfay Attila egyetemi tanárnak munkám során nyújtott megbízható segítségükért. Őszinte hálával tartozom kutatócsoportunk tagjainak Dr. Radács Marianna docens asszonynak, Molnár Zsolt tanársegédnek és Rácz László Dezső mérnök úrnak, valamint Miczák Péter munkatársunknak.

Nagyrabecsülésemet szeretném kifejezni Dr. Juhász Annának és Dr. Valkusz Zsuzsannának kutatási munkám során nyújtott értékes javaslataikért és tanácsaikért.

Külön köszönöm Dr. Szalontai Klára főorvos asszonynak és kórházi kollégáimnak támogató hozzáállásukat, valamint Dr. Bálint Beatrix főigazgató asszony széleskörű támogatását.

Végül köszönöm a Családom megértését, türelmét és bátorítását.

Köszönöm a TÁMOP4.1.1.C-12/1/KONV-2012-0012, a TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0035 és a Magyar Pulmonológia Alapítvány támogatását.

## 7. Irodalomjegyzék

1. E. Huag, S. Ishida, J. Pittman, H. Dressman, A. Bild, M. Kloos, M. D'Amigco, R. G. Pestell, M. West and J. R. Nevins, *Gene expression phenotypic models that predict the activity of oncogenic pathways*. Nature Genet 34:226-230, (2003).
2. H. Briethaupt, *Biological rhythms and biocommunication*. in: F. A. Popp et al.: *Electromagnetic Bioinformatin*. pp: 122-176, Urban & Schwarzenber, 2. Auflage, München-Wiwn-Baltimore (1989).
3. Z. Szallasi and S. Liang, *Modeling the normal and neoplastic cell cycle with "realistic Boolean genetic networks": their application for understanding carcinogenesis and assessing therapeutic strategies*. Pac Symp Biocomput, 66-76, (1998).
4. A. A. Berezin, *UHD effect and isotopic self-organization*. in: P.C. Ender and J. Schulte: *Ultra High Dilution*. pp: 217-298, Physiology and Physics, Kulwer Academic Publischer (1994).
5. S. E. Mancebo and S. Q. Wang, *Skin cancer: role of ultraviolet radiation in carcinogenesis*. Rev Environ Health 29(3):265-73, (2014).
6. M. Weselak, T. E. Arbuckle and W. Foster, *Pesticide exposures and developmental outcomes: the epidemiological evidence*. J Toxicol Environ Health B Crit Rev 10:41-80, (2007).
7. S. M. Zala and D. J. Penn, *Abnormal behaviours induced by chemical pollution: a review of the evidence and new challenges*. Animal Behaviour 68:649-664, (2004).
8. V. Csányi, *Viselkedés*. In *Etológia*. pp.: 135-145, Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest (2002).
9. V. Csányi, *Viselkedés és homeosztázis*. In *Etológia*. pp.: 149-157, Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest (2002).
10. V. Csányi, *Viselkedésmintázatok*. In *Etológia*. pp.: 165-185, Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest (2002).
11. R. J. Blanchard, P. M. Wall and D. C. Blanchard, *Problems in the study of rodent aggression*. Horm Behav 44:161-170, (2003).
12. P. J. Mitchell, *Antidepressant treatment and rodent aggressive behaviour*. Eur J Pharmacol 526:147-162, (2005).
13. V. Csányi, *Agresszió*. In *Etológia*. pp.: 205-245, Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest (2002).

14. E. Vermetten and J. D. Bremner, *Circuits and systems in stress. II. Applications to neurobiology and treatment in posttraumatic stress disorder*. *Depress Anxiety* 16:14-38, (2002).
15. R. J. Blanchard and D. C. Blanchard, *Aggressive behavior in the rat*. *Behav Biol* 21:197-224, (1977).
16. T. R. Gregg and A. Siegel, *Brain structures and neurotransmitters regulating aggression in cats: implications for human aggression*. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 25:91-140, (2001).
17. K. Pilkington, G. Kirkwood, H. Rampes, P. Fisher and J. Richardson, *Homeopathy for anxiety and anxiety disorders: a systematic review of the research*. *Homeopathy* 95:151-162, (2006).
18. A. Ennaceur, S. Michalikova and P. L. Chazot, *Models of anxiety: responses of rats to novelty in an open space and an enclosed space*. *Behav Brain Res* 171:26-49, (2006).
19. P. J. Tully, K. J. Wardenaar and B. W. Penninx, *Operating characteristics of depression and anxiety disorder phenotype dimensions and trait neuroticism: A theoretical examination of the fear and distress disorders from the Netherlands study of depression and anxiety*. *J Affect Disord* 174C:611-618, (2014).
20. F. W. Harper, A. M. Peterson, T. L. Albrecht, J. W. Taub, S Phipps and L. A. Penner, *Posttraumatic Stress Symptoms in Parents of Pediatric Cancer Patients: A Mediation Analysis*. *J Trauma Stress Disord Treat* 3(4). pii: 1000133 (2014).
21. M. Biondi and M. Valentini, *Relaxation treatments and biofeedback for anxiety and somatic stress-related disorders*. *Riv Psichiatri* 49(5):217-26, (2014).
22. G. Nagyeri, Z. Valkusz, M. Radacs, T. Ocsko, P. Hausinger, M. Laszlo, F. A. Laszlo, A. Juhasz, J. Julesz and M. Galfi, *Behavioral and endocrine effects of chronic exposure to low doses of chlorobenzenes in Wistar rats*. *Neurotoxicol Teratol* 34(1):9-19, (2012).
23. G. M. Williams and M. J. Iatropoulos, *Alteration of liver cell function and proliferation: differentiation between adaptation and toxicity*. *Toxicol Pathol* 30(1):41-53, (2002).
24. S. Yu, S. M. Weir, G. P. Cobb and J. D. Maul, *The effects of pesticide exposure on ultraviolet-B radiation avoidance behavior in tadpoles*. *Sci Total Environ* 481:75-80, (2014).
25. G. Multhoff, M. Molls and J. Radons, *Chronic inflammation in cancer development*. *Front Immunol* 12 January 2012 | doi: 10.3389/fimmu.2011.00098



26. V. Belloni, F. Dessì-Fulgheri, M. Zaccaroni, E. Di Consiglio, G. De Angelis, E. Testai, M. Santochirico, E. Alleva and D Santucci D, *Early exposure to low doses of atrazine affects behavior in juvenile and adult CD1 mice*. *Toxicology* 279(1-3):19-26, (2011).
27. A. Roy, J. Gong, D. C. Thomas, J. Zhang, H. M. Kipen, D. Q. Rich, T. Zhu, W. Huang, M. Hu, G. Wang, Y. Wang, P. Zhu, S. E. Lu, P. Ohman-Strickland, S. R. Diehl and S. P. Eckel, *The cardiopulmonary effects of ambient air pollution and mechanistic pathways: a comparative hierarchical pathway analysis*. *PLoS One*. 2014 Dec 12;9(12):e114913. doi: 10.1371/journal.pone.0114913. eCollection 2014
28. A. Gross, J. M. McDonnell and S.J. Korsmeyer, *BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis*. *Genes Dev* 13(15):1899-911, (1999).
29. C. J. Matheny, M. W. Lamb, K. R. Brouwer and G. M. Pollack, *Pharmacokinetic and pharmacodynamic implications of P-glycoprotein modulation*. *Pharmacotherapy* 21(7):778-96, (2001).
30. J. Molnar, M. D. Kars, U. Gündüz, H. Engi, U. Schumacher, E. J. Van Damme, W. J. Peumans, J. Makovitzky, N. Gyémánt and P. Molnár, *Interaction of tomato lectin with ABC transporter in cancer cells: glycosylation confers functional conformation of P-gp*. *Acta Histochem* 111(4):329-33, (2009).
31. B. Pajak, J. Molnar, H. Engi and A Orzechowski, *Preliminary studies on phenothiazine-mediated reversal of multidrug resistance in mouse lymphoma and COLO 320 cells*. *In Vivo* 19(6):1101-4, (2005).
32. D. Coradini and S. Oriana, *The role of maintenance proteins in the preservation of epithelial cell identity during mammary gland remodeling and breast cancer initiation*. *Chin J Cancer* 33(2):51-67, (2014).
33. S. F. Loh, C. Cooper, C. I. Selinger, E. H. Barnes, C. Chan, H. Carmalt, R. West, L. Gluch, J. M. Beith, C. E. Caldon and S. J. O'Toole, *Cell cycle marker expression in benign and malignant intraductal papillary lesions of the breast*. *Clin Pathol* 2014 Dec 12. pii: jclinpath-2014-202331. doi: 10.1136/jclinpath-2014-202331
34. G. R. Williams, A. M. Deal, K. A. Nyrop, M. Pergolotti, E. J. Guerard, T. A. Jolly and H. B. Muss, *Geriatric assessment as an aide to understanding falls in older adults with cancer*. *Support Care Cancer* 2015 Jan 10, PMID: 25576434
35. N. J. McCleary, E. Dotan and I. Browner, *Refining the chemotherapy approach for older patients with colon cancer*. *J Clin Oncol* 32(24):2570-80, (2014).

36. J. A. Cauley, J. Song, S. A. Dowsett, J. L. Mershon and S. R. Cummings, *Risk factors for breast cancer in older women: the relative contribution of bone mineral density and other established risk factors*. *Breast Cancer Res Treat* 102(2):181-8, (2007).
37. M. Lorencini, C. A. Brohem, G. C. Dieamant, N. I. Zanchin and H. I. Maibach, *Active ingredients against human epidermal aging*. *Ageing Res Rev* 15:100-15, (2014).
38. A. Jeney and J. Kralovánszky; *Onkofarmakológia. A mitotikus orsót gátló gyógyszerek*. 315-338, Medicina Könyvkiadó RT, Budapest 2005.
39. B. A. Hendricus. de Bont, G. G. Ruben. Leenders, W. Johan. Scheeren, Hidde J. Haisma and Dick de Vos, "*Paclitaxel prodrugs, method for preparation as well as their use in selective chemotherapy*." U.S. Patent US5760072, issued September, 1989
40. J. N. Sisti and S. C. Swindell, "*Method for docetaxel synthesis*." U.S. Patent US5688977, issued September, 1991. US5688977
41. S. Delle Monache, P. Sanità, A. Calgani, S. Schenone, L. Botta and A. Angelucci, *Src inhibition potentiates antitumoral effect of paclitaxel by blocking tumor-induced angiogenesis*. *Exp Cell Res* 328(1):20-31, (2014).
42. R. Kaur, G. Kaur, R. K. Gill, R. Soni and J. Bariwal, *Recent developments in tubulin polymerization inhibitors: An overview*. *Eur J Med Chem* 87C:89-124, (2014).
43. S. Yin, C. Zeng, M. Hari and F. Cabral, *Paclitaxel resistance by random mutagenesis of  $\alpha$ -tubulin*. *Cytoskeleton (Hoboken)*. 70(12):849-62, (2013).
44. S. Yin, C. Zeng, M. Hari and F. Cabral, *Random mutagenesis of  $\beta$ -tubulin defines a set of dispersed mutations that confer paclitaxel resistance*. *Pharm Res* 29(11):2994-3006, (2012).
45. Y. Zhuo and Q. Guo, *Down-regulated  $\beta$ III-tubulin expression can reverse paclitaxel resistance in A549/taxol cells lines*. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi* 17(8):581-7, (2014).
46. R. Matesanz, C. Trigili, J. Rodríguez-Salarichs, I. Zanardi, B. Pera, A. Nogales, W. S. Fang, J. Jiménez-Barbero, A. Canales, I. Barasoain, I. Ojima and J. F. Díaz, *Taxanes with high potency inducing tubulin assembly overcome tumoural cell resistances*. *Bioorg Med Chem* 22(18):5078-90, (2014).
47. K. Breivik, R. Alcock, Y. F. Li, R. E. Bailey, H. Fiedler and J. M. Pacyna, *Primary sources of selected POPs: regional and global scale emission inventories*. *Environ Pollut* 128:3-16, (2004).
48. T. Colborn, F. S. vom Saal and A. M. Soto, *Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans*. *Environ Health Perspect* 101:378-384, (1993).

49. B. M. Jenssen, *Endocrine-disrupting chemicals and climate change: A worst-case combination for arctic marine mammals and seabirds?* Environ Health Perspect 114 Suppl 1:76-80, (2006).
50. J. L. Barber, A. J. Sweetman, D. van Wijk and K. C. Jones, *Hexachlorobenzene in the global environment: emissions, levels, distribution, trends and processes.* Sci Total Environ 349:1-44, (2005).
51. R. S. Thomas, D. L. Gustafson, H. S. Ramsdell, H. A. el-Masri, S. A. Benjamin and R. S. Yang, *Enhanced regional expression of glutathione S-transferase P1-1 with colocalized AP-1 and CYP 1A2 induction in chlorobenzene-induced porphyria.* Toxicol Appl Pharmacol 150(1):22-31, (1998).
52. J. H. Xue, J. Z. Wang and P. Z. Xin, *Effects of chloroform, chlorobenzene and polychlorinated biphenyls on erythrocyte lipid peroxidation and membrane fluidity in poisoned rabbits.* Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi 28(5):294-6, (1994).
53. I. Lehmann, C. Röder-Stolinski, K. Nieber and G. Fischäder, *In vitro models for the assessment of inflammatory and immuno-modulatory effects of the volatile organic compound chlorobenzene.* Exp Toxicol Pathol 60(2-3):185-93, (2008).
54. A. Furka, *Aromás szénhidrogének.* In *Szerves Kémia* . (Ed. A. Furka) pp.: 249-274, Tankönyvkiadó Budapest, Budapest 1988.
55. J. R. van der Meer, W. M. de Vos, S. Harayama and A. J. Zehnder, *Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds.* Microbiol Rev 56(4):677-94, (1992).
56. J. L. Barber, A. J. Sweetman, D. van Wijk and K. C. Jones, *Hexachlorobenzene in the global environment: emissions, levels, distribution, trends and processes.* Sci Total Environ 349(1-3):1-44, (2005).
57. Y. Zheng, X. Zhu, P. Zhou, X. Lan, H. Xu, M. Li and Z. Gao, *Hexachlorophene is a potent KCNQ1/KCNE1 potassium channel activator which rescues LQTs mutants.* PLoS One 7(12):e51820. doi: 10.1371/journal.pone.0051820. Epub 2012 Dec 12.
58. R. M. Yan, Y. M. Chiung, C. Y. Pan, J. H. Liu and P. S. Liu, *Effects of dichlorobenzene on acetylcholine receptors in human neuroblastoma SH-SY5Y cells.* Toxicology 253(1-3):28-35, (2008).
59. D. Habauzit, G. Flouriot, F. Pakdel and C. J. Saligaut, *Effects of estrogens and endocrine-disrupting chemicals on cell differentiation-survival-proliferation in brain: contributions of neuronal cell lines.* Toxicol Environ Health B Crit Rev 14(5-7):300-27, (2011).

60. K. Jedeon, S. Loiodice, C. Marciano, A. Vinel, M. C. Canivenc Lavier, A. Berdal and S. Babajko, *Estrogen and bisphenol A affect male rat enamel formation and promote ameloblastproliferation*. *Endocrinology* 155(9):3365-75, (2014).
61. V. S. Gadepalli, S. P. Deb, S. Deb and R. R. Rao, *Lung cancer stem cells, p53 mutations and MDM2*. *Subcell Biochem* 85:359-70, (2014).
62. M. Gomes, A. L. Teixeira, A. Coelho, A. Araújo and R. A. Medeiros, *The role of inflammation in lung cancer*. *Adv Exp Med Biol* 816:1-23, (2014).
63. J. A. Barberà and V. I. Peinado, *Vascular progenitor cells in chronic obstructive pulmonary disease*. *Proc Am Thorac Soc* 8(6):528-34, (2011).
64. H. Breuer: *SH atlasz – Fizika*. Springer Hungarica Kiadó Kft. Budapest 1993 (ISBN 9637775587)
65. I. Hevesi: *Elektromosság*. Nemzeti Tankönyvkiadó. Budapest 1998 (ISBN 963188371 x)
66. N. Hamada, H. Matsumoto, T. Hara and Y Kobayashi, *Intercellular and intracellular signaling pathways mediating ionizing radiation-induced bystander effects*. *Radiat Res* 48(2):87-95, (2007).
67. 16/2000. (VI. 8.) EüM rendelet az atomenergiáról szóló 1996. évi CXVI. törvény egyes rendelkezéseinek végrehajtásáról.
68. S. Ottó and M. Kásler, *Trends in cancer mortality and morbidity in Hungarian and international statistics. Characteristics and potential outcome of public health screening programmes*. *Magy Onkol* 49:99–107, (2005).
69. T. Molnar and K. M. Barna, *Demográfiai jellemzők Magyarországon és az Európai Unióban, különös tekintettel a daganatos megbetegedések okozta halálózásra*. *Statisztikai Szemle* 90(6):544-558, (2012).
70. D. H. Dail, A. A. Liebow, J. T. Gmelich, P. J. Friedman, K. Miyai, W. Myer, S. D. Patterson and S. P. Hammar, *Intravascular, bronchiolar, and alveolar tumor of the lung (IVBAT). An analysis of twenty cases of a peculiar sclerosing endothelial tumor*. *Cancer* 51:452-464, (1983).
71. J. M. Mata, J. Caceres, J. Prat, J. I. López and O. Velilla, *Intravascular bronchio-alveolar tumor: Radiographic findings*. *Eur J Radiol* 12:95-97, (1991).
72. P. Bagan, M. Hassan, F. Le Pimpec Barthes, S. Peyrard, R. Souilamas, C. Danel and M. Riquet, *Prognostic factors and surgical indications of pulmonary epithelioid haemangioendothelioma: a review of the literature*. *Ann Thorac Surg* 82:2010-2013, (2006).

73. D. H. Dail and A. A. Liebow, *Intravascular bronchioalveolar tumor (Abstract)*. Am J Pathol 78:6-7, (1975).
74. B. Corrin, B. Manners, M. Millard et al, *Histogenesis of the so-called „intravascular bronchiolo-alveolar tumour”*. J Pathol 128:163-167, (1979).
75. B. K. Bollinger, W. B. Laskin and C. B. Knight, *Epithelioid hemangioendothelioma with multiple site involvement. Literature review and observations*. Cancer 73:610-615, (1994).
76. M. Kitaichi, S. Nagai, K. Nishimura, H. Itoh, H. Asamoto, T. Izumi and D. H. Dail, *Pulmonary epithelioid haemangioendothelioma in 21 patients, including three with partial spontaneous regression*. Eur Respir J 12:89-96, (1998).
77. R. Diaz, A. Segura, V. Caldereo, I. Cervera, J. Aparicio, M. V. Jordá and L. Pellín, *Central nervous system metastases of a pulmonary epithelioid haemangioendothelioma*. Eur Respir J 23:483-486, (2004).
78. A. C. Boudousquie, H. J. Lawce, R. Sherman, S. Olson, R. E. Magenis and C. L. Corless, *Complex translocation [7;22] identified in an epithelioid hemangioendothelioma*. Chest 127:1870-1871, (2005).
79. J. Kpodonu, C. Tshibaka and M. G. Massad, *The importance of clinical registries for pulmonary epithelioid hemangioendothelioma*. Chest 127:1870-1871, (2005).
80. C. Pinet, A. Magnan, L. Garbe, M. J. Payan and D. Vervloet, *Aggressive form of pleural epithelioid haemangioendothelioma: Complete response after chemotherapy*. Eur Respir J 14:237-238, (1999).
81. C. Roudier-Pujol, O. Enjolras, J. Lacronique, J. Guillemette, D. Herbreteau, M. Leibowitch and J. P. Escande, *Multifocal epithelioid hemangioendothelioma with partial remission after interferon-alfa2a treatment*. Ann Dermatol Venereol 121:898-904, (1994).
82. P. Csermely, *A rejtett hálózatok ereje*. Vincze Kiadó, Budapest 2005.
83. F. Fonnum and E. Mariussen, *Mechanisms involved in the neurotoxic effects of environmental toxicants such as polychlorinated biphenyls and brominated flame retardants*. J Neurochem 111(6):1327-47, (2009).
84. K. J. Painter, *Modelling cell migration strategies in the extracellular matrix*. J. Math Biol 58:511–543, (2009).
85. C. Müssel, M. Hopfensitz and H. A. Kestler, *BoolNet an R package for generation, reconstruction and analysis of Boolean networks*. Bioinformatics 26 (10):1378–1380, (2010).
86. T. Hunter, *Oncoprotein networks*. Cell 88(3):333-46, (1997).

87. A. Veliz-Cuba, *Reduction of Boolean network models*. J Theor Biol 289C:167–172, (2011).
88. A. Saadatpour, I. Albert and R. Albert, *Attractor analysis of asynchronous Boolean models of signal transduction networks*. J Theor Biol 266:641–656, (2010).
89. R. Palfoldi, M. Radacs, E. Csada, Z. Rozsavolgyi, L. Tiszlavicz, A. Somfay and M. Galfi, *Primary pulmonary epitheloid haemangioendothelioma*. Orv hetil 152(21):834-9, (2011).
90. Z. Valkusz, G. Nagyeri, M. Radacs, T. Ocsko, P. Hausinger, M. Laszlo, F. A. Laszlo, A. Juhasz, J. Julesz, R. Palfoldi and G. Galfi, *Further analysis of behavioral and endocrine consequences of chronic exposure of male Wistar rats to subtoxic doses of endocrine disruptor chlorobenzenes*. Physiol Behav 103(5):421-430, (2011).
91. T. Colborn, F. S. vom Saal and A. M. Soto. *Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans*. Environ Health Perspect 101, 378-384. (1993)
92. L. Reed, V. Buchner and P. B. Tchounwou, *Environmental toxicology and health effects associated with hexachlorobenzene exposure*. Rev Environ Health 22:213-243, (2007).
93. R. L. Sufit, R. Hodach, R. Arends, H. A. Peters, E. Erturk and D. J. Cripps, *Decreased conduction velocity and pseudomyotonia in hexachlorobenzene-fed rats*. IARC Sci Publ (77):361-362, (1986).
94. H. D. Menssen, N. Brandt, R. Leben, F. Müller, E. Thiel and K. Melber, *Measurement of hematological, clinical chemistry, and infection parameters from hirudinized blood collected in universal blood sampling tubes*. Semin Thromb Hemost 27(4):349-56, (2001).
95. M. Jurzak, U. Mazurek, W. Mazur, E. Wdowiak, Z. Gonciarz and T. Wilczok, *Increased AST and GGT activity as marker of RT-PCR inhibition in RNA extracts from peripheral blood*. Med Sci Monit 7 Suppl 1:231-5, (2001).
96. A. Kato, H. Sakakibara, H. Tsuboi, A. Tatsumi, M. Akimoto, K. Shimoi, T. Ishii, H. Kaneko, T. Nakayama and N. Ohashi, *Depressive symptoms of female nursing staff working in stressful environments and their association with serum creatine kinase and lactate dehydrogenase - a preliminary study*. Biopsychosoc Med 8:21, (2014).
97. C. W. Nogueira, L. P. Borges and A. C. G. Souza, *Oral administration of diphenyl diselenide potentiates hepatotoxicity induced by carbon tetrachloride in rats*. J Appl Toxicol 29:156-164, (2009).

98. D. Romero, M. Gomez-Zapata, A. Luna and J. A. Garcia-Fernandez, *Morphological characterization of BGM (Buffalo Green Monkey) cell line exposed to low doses of cadmium chloride*. *Toxicol In Vitro* 17(3):293–299, (2003).
99. E. Borenfreund and J. A. Puerner, *A simple quantitative procedure using monolayer culture for toxicity assays*. *J Tiss Cult Meth* 9:7–9, (1984).
100. H. Ren, X. Shi, L. Tao, J. Xiao, B. Han, Y. Zhang, X. Yuan and Y. Ding, *Evaluation of two decellularization methods in the development of a whole-organ decellularized rat liver scaffold*. *Liver Int* 33(3):448-58, (2013).
101. Y. H. Pei, X. M. Cai, J. Chen, B. D. Sun, Z. R. Sun, X. Wang and X. M. Qian, *The role of p38 MAPK in acute paraquat-induced lung injury in rats*. *Inhal Toxicol* 26(14):880-4, (2014).
102. T. Janaky, P. Szabo, Z. Kele, L. Balaspiri, C. Varga, M. Galfi, M. Vecsernyes, L. Gaspar, A. Juhasz and F. A. Laszlo, *Identification of oxytocin and vasopressin from neurohypophyseal cell culture*. *Rapid Commun Mass Spectrom* 12:1765–1768, (1998).
103. M. Galfi, T. Janaky, R. Toth, G. Prohaszka, A. Juhasz, C. Varga and F. A. Laszlo, *Effects of dopamine and dopamine-active compounds on oxytocin and vasopressin production in rat neurohypophyseal tissue cultures*. *Regul Pept* 98:49–54, (2001).
104. P. G. Kennedy, R. P. Lisak and M. C. Raff MC, *Cell type-specific markers for human glial and neuronal cells in culture*. *Lab Investig* 43:342–51, (1980).
105. A. Michlerstuke and J. E. Bottenstein, *Proliferation of glial-derived cells in defined media*. *J Neurosci Res* 7:215–28, (1982).
106. P. Klivenyi, Z. Bende, Z. Hartai, Z. Penke, H. Nemeth, J. Toldi and L. Vecsei, *Behaviour changes in a transgenic model of Huntington's disease*. *Behavioural Brain Research* 169:137-141, (2006).
107. E. Mikics, M. R. Kruk and J. Haller, *Genomic and non-genomic effects of glucocorticoids on aggressive behavior in male rats*. *Psychoneuroendocrinology* 29:618-635, (2004).
108. E. Biro, B. Penke and G. Telegdy, *Role of different neurotransmitter systems in the cholecystinin octapeptide-induced anxiogenic response in rats*. *Neuropeptides* 31:281–5, (1997).
109. Common Terminology Criteria for Adverse Events, version 3.0 issued by National Cancer Institute EORTC, 09.08, 2006.  
[https://ctep.cancer.gov/protocolDevelopment/electronic\\_applications/docs/ctcae3.pdf](https://ctep.cancer.gov/protocolDevelopment/electronic_applications/docs/ctcae3.pdf)

110. A. Maráz, J. Furák, Z. Varga, E. Fodor, Z. Együd, E. Borzási, Z. Kahán, R. Pálföldi, L. Tiszlavicz and K. Hideghéty, *Acute oesophageal toxicity related to paclitaxel-based concurrent chemoradiotherapy for non-small cell lung cancer*. *Anticancer Research* 33(4):1737-1741, (2013).
111. A. Maraz, J. Furak, R. Palfoldi, J. Eller, E. Szanto, Z. Kahan, L. Thurzo, J. Molnar, L. Tiszlavicz and K. Hideghety, *Roles of BCL-2 and MDR1 expression in the efficacy of paclitaxel-based lung cancer chemoradiation*. *Anticancer Research* 31(4):1431-1436, (2011).
112. R. Palfoldi, M. Radacs, E. Csada, Z. Molnar, S. Pinter, L. Tiszlavicz, J. Molnar, Z. Valkusz, A. Somfay and M. Galfi, *Pulmonary epithelioid haemangioendothelioma studies in vitro and in vivo: new diagnostic and treatment methods*. *In Vivo* 27(2):221-5, (2013).
113. M. Galfi, T. Janaky, R. Toth, G. Prohaszka, A. Juhasz, C. Varga and F. A. Laszlo, *Effects of dopamine and dopamine-active compounds on oxytocin and vasopressin production in rat neurohypophyseal tissue cultures*. *Regul Pept* 98:49–54, (2001).
114. O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall, *Protein measurement with the Folin-phenol reagents*. *J Biol Chem* 193:265-275, (1951).
115. M. J. Dunn: *Protein determination of total protein concentration*. In: *Protein Purification Methods*. Harris EL and Angal S (eds.). Oxford, IRL Press. 1992.
116. M. Griffiths and H. Sundaram, *Drug design and testing: profiling of antiproliferative agents for cancer therapy using a cell-based methyl-[3H]-thymidine incorporation assay*. *Methods Mol Biol* 731:451-65, (2011).
117. L. M. Muul, G. Heine, C. Silvin, S. P. James, F. Candotti, A. Radbruch and M. Worm, *Measurement of proliferative responses of cultured lymphocytes*. *Curr Protoc Immunol* 7(10).1-24, (2008).
118. K. S. Louis and A. C. Siegel, *Cell viability analysis using trypan blue: manual and automated methods*. *Methods Mol Biol* 740:7-12, (2011).
119. A. Doyle, J. B. Griffiths and D. G. Newell (eds.), *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures*. Chichester, John Wiley & Sons, Inc., 1995.
120. A. M. Perry, Y. Alvarado-Bernal, J. A. Laurini, L. M. Smith, G. W. Slack, K. L. Tan, L. H. Sehn, K. Fu, P. Aoun, T. C. Greiner, W. C. Chan, P. J. Bierman, R. G. Bociek, J. O. Armitage, J. M. Vose, R. D. Gascoyne and D. D. Weisenburger, *MYC and BCL2 protein expression predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab*. *Br J Haematol* 165(3):382-91, (2014).



121. S. Aust, S. Pils, S. Polterauer, R. Horvat, D. Cacsire Castillo-Tong, D. Pils, G. Dudek, B. Schmid, P. Speiser, A. Reinthaller and C. Grimm, *Expression of Bcl-2 and the antiapoptotic BAG family proteins in ovarian cancer*. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 21(6):518-24, (2013).
122. J. Verstraelen and S. Reichl, *Expression analysis of MDR1, BCRP and MRP3 transporter proteins in different in vitro and ex vivo cornea models for drug absorption studies*. *Int J Pharm* 441(1-2):765-75, (2013).
123. J. Xie, D. W. Li, X. W. Chen, F. Wang and P. Dong, *Expression and significance of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  and MDR1/P-glycoprotein in laryngeal carcinoma tissue and hypoxic Hep-2 cells*. *Oncol Lett* 6(1):232-238, (2013).
124. K. Christensen, C. Aaberg-Jessen, C. Andersen, D. Goplen, R. Bjerkvig and B. W. Kristensen, *Immunohistochemical expression of stem cell, endothelial cell, and chemosensitivity markers in primary glioma spheroids cultured in serum-containing and serum-free medium*. *Neurosurgery* 66(5):933-47, (2010).
125. Y. L. Ma, J. Y. Peng, P. Zhang, W. J. Liu, L. Huang and H. L. Qin, *Immunohistochemical analysis revealed CD34 and Ki67 protein expression as significant prognostic factors in colorectal cancer*. *Med Oncol* 27(2):304-9, (2010).
126. S. K. Baek, K. Y. Jung, S. H. Lee, J. S. Woo, S. Y. Kwon, E. J. Chung, T. H. Kim and Y. S. Chae, *Prognostic significance of vascular endothelial growth factor-C expression and lymphatic vessel density in supraglottic squamous cell carcinoma*. *Laryngoscope* 119(7):1325-30, (2009).
127. R. Sebastia, M. P. Ventura, H. P. Solari, E. Anteck, M. E. Orellana and M. N. Burnier Jr, *Immunohistochemical detection of Hsp90 and Ki-67 in pterygium*. *Diagn Pathol* 2013 Feb 21;8:32. doi: 10.1186/1746-1596-8-32.
128. T. Kaneko, T. Okiji, R. Kaneko, H. Suda and J. E. Nor, JE. *Laser-capture microdissection for Factor VIII-expressing endothelial cells in cancer tissues*. *Methods Mol Biol* 755:395-403, (2011).
129. H. Kreizman-Shefer, J. Pricop, S. Goldman, I. Elmalah and E. Shalev, *Distribution of estrogen and progesterone receptors isoforms in endometrial cancer*. *Diagn Pathol* 2014 Mar 31;9:77. doi: 10.1186/1746-1596-9-77.
130. N. Shabani, I. Mylonas, U. Jeschke, A. Thaqi, C. Kuhn, T. Puchner and K. Friese, *Expression of estrogen receptors alpha and beta, and progesterone receptors A and B in human mucinous carcinoma of the endometrium*. *Anticancer Res* 27(4A):2027-33, (2007).

131. Z. Molnár, R. Pálföldi, A. László, M. Radács, M. László, P. Hausinger, L. Tiszlavicz, Z. Rázga, Z. Valkusz and M. Gálfi, *The effects of hypokalaemia on the hormone exocytosis in adenohypophysis and prolactinoma cell culture model systems*. *Exp and Clin Endocrinol & Diabetes* 122(10):575-81, (2014).
132. J. Shapiro and G. E. Richardson, *Hyponatremia of malignancy*. *Crit Rev Oncol Hematol* 18(2):129-35, (1995).
133. J. J. Castillo, M. Vincent and E. Justice, *Diagnosis and management of hyponatremia in cancer patients*. *Oncologist* 17(6):756-65, (2012).
134. C. Petereit, O. Zaba, I. Teber, H. Lüders and C. Grohé, *A rapid and efficient way to manage hyponatremia in patients with SIADH and small cell lung cancer: treatment with tolvaptan*. *BMC Pulm Med* 2013 Aug 29;13:55 doi: 10.1186/1471-2466-13-55
135. A. Ijaz, T. Mehmood, A. H. Qureshi, M. Anwar, M. Dilawar, I. Hussain, F. A. Khan, S. Hussein and I. A. Khan, *Estimation of ionized calcium, total calcium and albumin corrected calcium for the diagnosis of hypercalcaemia of malignancy*. *J Coll Physicians Surg Pak* 16(1):49-52, (2006).
136. A. M. Swart, M. K. Parmar, P. Harper, N. Colombo and V. Torri, *The European Canadian Intergroup trial (OV10 trial) and the US Gynaecologic Oncology Group trial (GOG 111)*. *Int J Gynecol Cancer* 14(4):697, (2004).
137. D. H. Johnson, *Phase III trial (E5592) comparing cisplatin plus etoposide with cisplatin plus aclitaxel at two dose levels for treatment of advanced non-small-cell lung cancer. Eastern Cooperative Oncology Group*. *J Natl Cancer Inst Monogr.* (19):61-3, (1995).
138. E. A. Eisenhauer and J. B. Vermorken, *The taxoids. Comparative clinical pharmacology and therapeutic potential*. *Drugs* 55(1):5-30, (1998).
139. P. Bonomi, *Eastern Cooperative Oncology Group experience with chemotherapy in advanced non-small cell lung cancer*. *Chest* 113(1 Suppl):13S-16S, (1998).
140. G. Németh, *A tüdőtumороk sugárterápiája*. In *Sugárterápia*. pp.: 263-275, Springer. Budapest (2001).
141. Nyilvántartott – és az E. Alapból a 959A-L illetve a 9511- 9515 HBCs-k szerint finanszírozott – daganatellenes terápiák kézikönyve (Gyógyinfok)
142. A. Paldy and B. Vaskövi, *A perzisztens szerves vegyületek előfordulása és környezet-egészségügyi jelentősége*. Országos Közegészségügyi Intézet, Tanulmány, (2003).

## 8. Összefoglalás

A homeosztázis az élő rendszerek olyan egyensúlyi komplexitásának állapota, amely biztosítja, hogy az adott biológiai rendszer életjelenségeinek fenntartása folyamatosan és hatékony optimalizáltság mellett valósuljon meg. Az élő rendszerek belső környezetük állandóságát a folyamatosan változó külső környezethez való alkalmazkodás során biztosítják. A környezeti feltételek változásai (pl.: fizikai: elektromágneses sugárzások, ionizáló sugárzások, kémiai: endokrin diszruptor környezeti ágensek) már szubtoxikus dózisban is megváltozott környezeti potenciált eredményeznek, melyek az élő szervezetet válaszreakció láncolatok kialakítására kényszerítik, ezek közül általában az első, jól identifikálható forma a fajra és az egyedre jellemző ösztönös és/vagy tanult viselkedésmintázatok módosulása és/vagy megváltozása. Az állatvilág és az ember szociális viselkedését (pl.: agresszió, szorongás) ezen viselkedésmintázat módosulások az egyensúlyi tartományból a társas szinten nem jól alkalmazkodó, azaz negatív irányba terelheti. A környezeti feltételek változásai hatására gyulladáshoz vezető folyamatok is kialakulhatnak, melyekből krónikus expozíciók esetén kóros sejtttranszformációk jöhetnek létre.

A környezeti alkalmazkodási potenciál vesztésének eredményeként kialakult, óriási társadalmi problémát jelentő daganatok kezelése jelenleg a daganatsejtek elpusztítására fókuszál, a kialakulás okát képviselő esetleges környezeti tényezőket nem kezeli hangsúlyosan. A kiváltó okok tekintetében nagy jelentőséggel bírnak azok, amelyek a belső homeosztatisz egyensúly zavarának kialakításán keresztül idézik elő a kóros sejtburjánzást - pl. az EDC vegyületek, melyek környezetünkben természetes (pl. taxánok) és szintetikus (pl. klórbenzolok) formában vannak jelen. Ezen természetes anyagok alkalmasak a környezetterhelési folyamatok modellezésére. Egy részükről ismert, hogy hatékonyan képesek gátolni pl. a sejtproliferációt, ezáltal daganatellenes hatással is bírnak (taxánok).

Az evolúciót meghatározó fizikai-energia formák, egyrészt környezetünk természetes, másrészt társadalmi tevékenységekből származhatnak (pl. elektromágneses sugárzások). A sugárhatás dózissal jellemzett, ennek követése a humánorvoslásban a terápiás eljárásokhoz kötötten jól ismert és dokumentált. Az ionizáló sugárzások az osztódó sejteket dózis és behatás függően apoptotikus útra terelik, így a terápiás gyakorlatból nagyon sok hiteles információval rendelkezünk a célzott és nem célzott sejteket, szöveteket érő hatásokról.

Hazánk listavezető a rákhalálzási statisztikák terén, így különös jelentősége lehet ebben a vonatkozásban az egyes újonnan megjelenő biológiai alkalmazkodási módok vizsgálatának. Ezek lehetnek olyan sejtproliferációs problémakörök is, amelyek az új, a ritka

tumoros kórképek megjelenését érintik (pl. pulmonális epitheloid haemangioendothelioma). Mivel az adott PEHE kórképnek a környezeti alkalmazkodási potenciállal való követésének jelentősége a terápia szempontjából hasznos, így ennek érdemes olyan markereit megtalálni, és követni, amelyek nemcsak terápiás hatékonyságukban előnyösebbek, hanem az általános biológiai mechanizmus feltárásához is közelebb visznek.

Kutatási stratégiánk az igazoltan egészséges állapotot és annak változásait (transzformált) követte a daganatok kialakulási eseménykaszkádján keresztül olyan módon, hogy a lezajló folyamatok állapotváltozásaira (trajektória módosulásaira) találjunk jellemző markereket; továbbá ezekhez a környezetállapotok változásainak követését keresve az ok-okozati összefüggéseket a feltétel módosulás és rendszerátalakulások között.

Jelen munkánkban a környezeti szempontból jelentős hatásokat kívántuk modellszinten értelmezni, majd ennek megfelelően biológiai jelentősége szerint karakterizálni. Az expozíció választás mellett az alkalmas kutatási és vizsgálati modellek (*in vivo* és *in vitro*) kialakítása és standardizálása is feladatunk volt, fontosnak véltük a beteganyagok tanulmányozását. A kialakított kutatási modellekkel végzett vizsgálatokban arra is kerestük a választ, hogy a különböző EDC hatású (CIB) anyagok pszicho-neuro-endokrin- rendszerre gyakorolt hatása során melyek lehetnek az első értékelhető rendszerválaszok. A krónikus expozíciók (*in vivo* szubtoxikus – kémiai és/vagy fizikai expozíciók) következtében esetlegesen kialakuló gyulladások és az ezek révén felszabaduló mediátorok a sejt-transzformációban is szerepet vállaló kommunikációs markerek esetleges szerepét is vizsgáltuk. Választ kívántunk keresni arra a kérdésre, hogy miként lehetne a daganatok esetén a megfelelő terápia kiválasztását és/vagy a környezeti potenciál alakulásának változásait új, dinamikus módszerekkel követni. Mindezek mellett az adott biológiai rendszer alkalmazkodási potenciáljának fenntartását meghatározó folyamatirányok megismerése is célunk volt.

Munkánk során *in vivo* (Wistar patkányok szubtoxikus dózisével CIB kezelése; Wistar patkányok egészséges és prolaktinomás hipofíziséből készített sejt kultúrák vizsgálata alacsony extracelluláris  $[Na^+]$  és  $[K^+]$  szint tükrében, tüdő tumoros betegek sugárkezelés kapcsán kialakult nyelőcsőgyulladás vizsgálata, valamint kissejtes tüdő tumorban kialakult hiponatrémia prediktív szerepének vizsgálata) és *in vitro* (CIB kezelt patkányok szervmintáiból illetve humán daganatszövetből monolayer, primer sejt kultúrák, explant kultúrák kialakítása) vizsgálatokat végeztünk.

### **Eredményeink:**

Az egyedszintű EDC hatású, de igazoltan szubtoxikus koncentrációban alkalmazott CIB pszicho-neuro-endokrin- rendszerre gyakorolt hatásainak tanulmányozására viselkedés

vizsgálatokat állítottunk be. Megállapíthattuk, hogy sem szignifikáns, de még trend jellegű eltéréseket sem tapasztaltunk a kontroll csoportok között, így az eredmények interpretálásánál már nem az összes kontrollcsoport paramétereit, csak az abszolút kontroll /A(K)/ eredményeit tüntettük fel. Megállapítható volt továbbá, hogy a szubtoxikus dózisu (0,1 és 1,0  $\mu\text{g}/\text{ts.kg}$ ), krónikus CIB kezelés hatására mind az agresszióval, mind a szorongással összefüggésbe hozható viselkedéselemek kifejeződései erősödtek. A 90 napos kezelést követően már minden viselkedéselem szignifikáns eltérést mutatott mindkét dózisban. Azonban az alacsonyabb dózisu expozíciók hatása még a 60 napos kezelési periódusban nem igazolt a viselkedésmintázatban szignifikáns eltérést. Ez az eredmény azt sugallja, hogy 0,1  $\mu\text{g}/\text{ts.kg}$  expozíciós CIB dózis alkalmazása esetén már közelítünk a hatásküszöbhez az agresszív viselkedés elem követése kapcsán. Vizsgálataink alapján megállapítható, hogy az alkalmazott, igazoltan szubtoxikus dózisu CIB kiválthat olyan, a források megszerzésére irányuló hátrányos magatartásmintázatot, ami tovább erősítheti a még strukturálisan (biológiai organizmusszervezeti rendszerében) nem fixálódott CIB okozta hatás-eltéréseket. További fontos megállapításunk, hogy a CIB expozíciók révén kapott eredmények a halogénezett szénhidrogének hatásaival kapcsolatban hozott társadalmi intézkedések átgondolását is indokolják.

Amikor a mesterséges ionizáló sugárzást a sugárterápia során alkalmazzuk, akkor annak apoptózist indukáló hatása nemcsak a besugarazni kívánt célterületen jelentkezik. Ilyenkor tehát detektálhatóan, szubtoxikus dózisu ionizáló sugárhatás következik be a targetvolumenen kívül eső szervekben. A tüdőkarcinómák célzott sugárkezelése kapcsán a nem célzott nyelőcső területen kialakuló hatások követésére nyílt lehetőség, amelyekkel a gyulladással járó folyamatok kiváltásának biztosítása mellett annak súlyossági fokozatait is követhetjük. Megállapítottuk, hogy a nyelőcső sugárhatással kiváltott elváltozásai és a dózis-volumen paraméterek között összefüggés van.

A krónikus gyulladással járó folyamatok előrehaladt állapotban sokszor alakulnak tumorrá, amely már a teljes rendszerviselkedés átalakulását jelzi. Munkánk során kerestük azokat a genomialis markereket, amelyekkel a vázolt igen hosszú struktúra, majd rendszerciklus változási folyamat követhető. A BCL2 és MDR1 expresszió mennyiségi követése - természetesen egyéb markerekkel együtt, melyek jelenlegi vizsgálataink tárgyai - lehetőséget nyújt a strukturális zavarok és az állapotciklusok változásainak tanulmányozására.

A dolgozatban már igazoltan kiválasztott BCL2 és MDR1 általános követési paraméterek mellett a terápiát is segítő egyéb specifikus markereket is meghatároztunk. A PEHE tumor esetében *in vitro* modelleken végzett különféle tumor-kezelésben alkalmazott ágensek hatásait tanulmányoztuk (pl. vinorelbine; carboplatin; docetaxel; paclitaxel) a leghatékonyabb terápiás

lehetőség kiválasztása céljából. Az alkalmazott *in vitro* modellvizsgálat lehetőséget biztosított a tartós, több generációs sejt kultúrákon zajló dinamikus sejtviselkedések tanulmányozására is. Korábbi kutatásainkból plazmid-törölő hatásáról ismert promethazint is bevontuk vizsgálatainkba. Eredményeink szerint a promethazin jelenlétében még hatékonyabban sikerült a PEHE kultúrák, - általunk kiválasztott taxán (paclitaxel) jelenlétében - szignifikánsan csökkent sejtproliferációját visszaszorítani. A terápiás kezelési sémát tehát ennek megfelelően lehetett kialakítani, amit igazolt annak eredményessége. Az *in vivo* terápia hatását is követtük újabb mintavételekből származó modellek kialakításával. Igazolódott a promethazin MDR1-t gátló hatása, hiszen *in vitro* továbbkezelés TXT jelenlétében szignifikánsan csökkentette a sejtproliferációt. Az *in vivo* zajló tumoros állapotok követésére és a terápiás célzottság tekintetében hatékonyabb beavatkozások kialakítására jelen vizsgálatok szerint a dinamikus *in vitro* modellek alkalmazása igen megfelelőnek tekinthető, és ezáltal társadalmi szempontból sem lényegtelen, hogy eredményeink közvetlen hasznosulhatnak az egészségügyi ellátásban.

Az egészségügyi ellátás terápiás protokolljainak hatékonyság fokozása mellett, az adott betegségek (pl. kissejtes tüdőcarcinóma) prognózisának pontosabb megismerése is célunk volt. Kutatási adataink igazolták, hogy az extracelluláris hiponatrémia- vagy hipokalémia megváltoztatja az egészséges és tumoros sejtek exocitotikus aktivitását. Azt is bizonyította kutatásunk, hogy a normál és tumoros sejtek hormon-elválasztási kinetikája eltérő karakterisztikákat mutat, melyekben a dekompenzáltóság minden esetben a tumoros sejt kultúráknál volt kifejezettebb. Ebben a kontextusban a sejt, mint rendszer és környezete, mint a rendszer feltétele, - azaz vonzási tartománya - együttesen határozza meg azt az aktuális mintázatot, amivel a sejt élő komplexitását fenntartja. A megváltozott állapotciklust mutató sejtek tumoros struktúrát és folyamatrendszert mutatnak. Jelen tudásunk szerint ez még csak prognózisok meghatározását teszi lehetővé, de a terápiás szempontok okán ez is nagyon jelentős. Az *in vitro* elvégzett kutatási protokollok, melyek a sejtek lokális környezetének és a sejt funkciók közötti kapcsolatokat vizsgálta, szoros összefüggéseket tapasztaltunk. Ezt az összefüggést ismerve kerestük tumoros betegnél a hiponatrémiát, és ha jelen volt, vizsgáltuk, hogy van e túlélési prediktív marker jelentősége. Eredményeink szerint az ionmilió további konzekvens vizsgálata tehát indokolt a tumoros betegségekben.

### **Új eredményeink:**

1. A *környezet alkalmazkodási potenciál* meghatározására irányuló rendszerösszefüggések tanulmányozására alkalmas modellrendszerek kerültek kialakításra.

2. Szubtoxikus dózisú kémiai környezeti ágens (CIB) viselkedési elemek (szorongás, agresszió) zavarát kiváltó hatása igazolódott. Továbbá ennek, a környezeti alkalmazkodási potenciál szempontjából meghatározható jelentősége bemutatásra került.
3. Igazoltta vált a fizikai (mesterséges ionizáló sugárzás terápiás dózisban: 45-71 Gy) expozíciók által kiváltott kis zavarok követési módszerének alkalmazhatósága, koherensen a strukturális zavar markereivel: BCL2, MDR1.
4. Két, eltérő állapotciklus követésére alkalmas dinamikus diagnosztikus és terápia megalapozó módszer került kialakításra a PEHE kapcsán munkánkban. Ebben a megváltozott állapotciklust mutató tumor-sejtek viselkedését a nyomjelző faktorok szempontjából (pl. az MDR1 tekintetében is) a tumor-progresszióra vonatkoztatva vizsgáltuk.
5. A tumoros és egészséges sejtek sejtciklusai (attraktorai; Adh és PRLoma) a környezetük vagy feltételeik (vonzási tartomány) módosulásai (extracelluláris ionkoncentrációk csökkenése) révén komplexitásukban mutattak igazoltan eltérést. Ezek a tumoros kultúrák sejtjei dekompenzált karakterisztikákat jelenítettek meg mind az ACTH, mind a PRL elválasztásban.
6. Az Adh és PRLoma attraktorok modelljeinek tanulmányozásával nyert eredményeket extrapoláltuk humán esetekre. Rendszerbiológiai megközelítés szerint hipotézisünk igazolódott: miszerint csak a vonzási tartomány szerinti extrapoláció lehetséges még jelen ismeretink birtokában. Továbbá konkrét kutatással igazoltuk, hogy az elszigetelt és kisméretű rendszerelem-változások (sejt) hatásait az egyre magasabb szinten szervezett rendszer (pl. organizmus) képes kompenzálni, harmonizálni, a szétterjedt és nagyméretű változások esetében viszont nem.

## Summary

Homeostasis is the complex balance of living systems, which insures that the life phenomena of a given biological system take place in a continuous and optimized manner. In order to insure the stability of the internal environment, living systems adapt to the constantly changing external environment. Changes in the environmental conditions (*eg* physical: electromagnetic and ionizing radiation; chemical: endocrine disrupting environmental chemicals) cause a change in the environmental potential even at sub-toxic doses, which force the living organism to create a chain of reactions; the first identifiable form of these is the modification and/or change of the behavior pattern, depending on the complexity of the individual. The social behavior (*eg* aggression, anxiety) of humans and the animal world may be herded from the healthy, homeostatic balance range to the socially unfavorably adapting, *ie* negative range. As a consequence of the changes in environmental conditions, inflammatory lesions and processes may develop; should the exposition become chronic, they may turn into pathological cell transformations.

The treatment of an enormous problem of society, tumors, which develop as a result of the environmental adaptation potential loss, concentrates on the destruction of tumor cells, it does not place emphasis on addressing the possible environmental factors, which may represent the cause. Most significant of the root causes are those which induce cell proliferation by creating a disturbance in the inner homeostatic balance - *eg* EDC, which are present in our environment in natural (*eg* taxanes) and synthetic (*eg* chlorobenzenes) forms. These natural agents are suitable models of the environmental load processes. Some of these substances are known to inhibit cell proliferation, thus possess an antitumor effect (taxanes).

Physical energy forms, which determine evolution, may come from natural or artificial (*eg* electromagnetic radiation) sources. Radiation effect is characterized by dose, its following is well known and documented in medicine, as a part of treatment. Ionizing radiations force proliferating cells to take the apoptotic route (depending on dose and time period), thus enough accurate data is accessible on the effects on targeted, as well as non-targeted cells and tissues from therapeutic practice.

Hungary leads the cancer mortality statistics, therefore, the research of certain novel biological adaptation methods could be of particular importance. These may be such cell proliferation problems as new, rare tumorous diseases, *eg* PEHE. Since it is beneficial for the therapy of PEHE disease to follow the environmental adaptation potential, it is useful to find and follow markers which are not only more effective in their therapeutic efficiency, but also bring us closer to the exploration of the general biological mechanisms.



Our research strategy was to follow proven healthy states and their changes (transformations) via development of tumors in such a way that it is possible to find characteristic markers for the state changes (alterations of trajectory) of the processes taking place; furthermore, we attempted to explore the cause and effect relationship between condition modification and system changes.

In the present work we wished to realize the examination of biological systems in a model, and characterize them according to their biological significance. In addition to choosing an exposition, creating and standardizing adequate research and investigation models (*in vivo* and *in vitro*), and studying patient test results were also important tasks.

In the work with the created study models we also looked for the answer to the question of which could be the first relevant system responses of the psycho-neuro-endocrine system to the different EDC (CIB). As a result of chronic exposition (*in vivo* sub-toxic - chemical and/or physical expositions), inflammation can develop and the possible role of the released mediators (communication markers) in cell transformation was investigated. We wished to find the answer to how could choosing the appropriate cancer treatment and/or the changes of the environmental potential be followed by new, dynamic methods. In addition, exploring the process directions responsible for sustaining the adaptation potential of the given biological system was also our aim.

During our work, *in vivo* (treatment of Wistar rats with sub-toxic doses of CIB; inspection of cell cultures made from the healthy and prolactinomic hypophyses of Wistar rats with the emphasis on extracellular  $[Na^+]$  and  $[K^+]$ , investigation of esophagitis in lung cancer patients receiving radiation therapy, and the investigation of the predictive role of hyponatraemia in small-cell lung cancer patients) and *in vitro* (making monolayer, primary cell cultures, and explant cultures from the organ samples of CIB treated rats and human tumor tissue) experiments were carried out.

### **Results:**

Behavior studies were set up to investigate the effects of proven sub-toxic concentrations of CIB, which has an EDC effect at the level the individual on the psycho-neuro-endocrine system. It was determined that there are no significant, or even trend-like deviations between the control groups, therefore, only the results of the absolute control group (A /K/) were listed when interpreting further results. It could also be determined that as a result of chronic CIB treatment at a sub-toxic dose (0.1 and 1.0  $\mu\text{g}/\text{bwkg}$ ) behavior elements connected to aggression or anxiety intensified. After the 90-day treatment every behavior element showed a significant deviation at both doses. However, the effects of the lower dose exposition did not present the described significant deviation even in the 60-day treatment period in every

investigated behavior pattern. This result leads one to believe that 0.1 µg/bwkg ClB exposition approaches the effect threshold for aggressive behavior. Thus it can be said that the applied, proven sub-toxic ClB dose can trigger an unfavorable behavior pattern, which may further intensify the structurally (in its organism system) unfixed effect deviations caused by ClB. A further important finding is that the results gained by ClB expositions justify the reconsideration of social measures relating to the effects of halogenated hydrocarbons.

When artificial ionizing radiation is used in the course of radiation therapy, its apoptosis inducing effect is calculated for the target area. However, radiation also affects areas which are not targeted during therapy; this is when sub-toxic dose ionizing radiation can be detected. When targeted radiation therapy is used for the treatment of lung cancers, effects can also be found and followed in the untargeted esophagus; this way, in addition to insuring the triggering of inflammatory processes, their progression could also be followed. An association was found between the irregularities of the esophagus caused by radiation effect, and the dose-volume parameters.

Advanced stage chronic inflammatory processes often transform into a tumor, which signals the restructuring of the whole system behavior. In the present study we searched for those genomic markers which enable one to follow the described, rather long structure and the system cycle changing process. The quantitative follow-up of BCL2 and MDR1 expression - along with other markers, which are the subjects of our ongoing studies - makes it possible to study the structural disorders and the state cycle changes.

In addition to the chosen BCL2 and MDR1 general follow-up parameters, other specific markers which help therapy, have also been determined. In the case of the PEHE tumor the effects of various cancer treatment agents (*eg* vinorelbine; carboplatin; docetaxel; paclitaxel) were studied in *in vitro* models for the sake of finding a definite therapy. The applied *in vitro* model study provided an opportunity to study dynamic cell behaviors on multigenerational cell cultures.

Promethazine, known from our earlier studies for its anti-plasmid effect, was also investigated in the present study. According to our results, the significantly decreased cell proliferation of PEHE cultures - in the presence of a chosen taxane (paclitaxel) - was further hindered with promethazine. The therapeutic scheme could be created accordingly, and was justified by its efficiency. The effects of the *in vivo* therapy were also followed by models created from newly acquired samples. The MDR1 inhibiting effect of promethazine was confirmed, as further *in vitro* treatment in the presence of docetaxel (TXT) significantly decreased cell proliferation. According to the present study, to follow *in vivo* tumorous states and to create a more efficiently targeted intervention, the application of dynamic *in vitro* models seems a

valuable option, therefore, the fact that our results can be of direct benefit for health care, is important for our society as well.

Apart from increasing the efficiency of health care therapy protocols, it was also our objective to explore more accurately the prognosis of certain diseases (*eg* small-cell lung cancer). Our research data proved that extracellular hyponatraemia or hypokalaemia modifies the exocytotic activity of both healthy and tumorous cells. It also confirmed that the hormone secretion kinetics of normal and cancerous cells shows variation, and decompensation is more marked in tumorous cell cultures in every case. In this context the cell, as a system, and its environment, as the condition of the system (*ie* its domain of attraction) collectively determine the current pattern, with which the cell sustains its complexity. Cells showing a modified state cycle exhibit a tumorous structure and process system. According to our present knowledge, this only enables one to make prognoses; however, this, too, is significant for treatment. The protocols carried out *in vitro* examining the relationship between the local environment of cells and the cell functions, a strong association was found. We looked for hyponatraemia in cancer patients knowing this relationship, and if it was present, its suitability as a survival prediction marker was explored. As reported by our results, further consequent investigation of the ionic milieu in cancer patients is warranted.

**New findings:**

- 1 Model systems suitable for the study of system associations defining *environmental adaptation potential* have been created.
- 2 The behavior (anxiety, aggression) disrupting effect of sub-toxic doses of a chemical environmental agent (CIB) has been confirmed. Furthermore, the significance of this effect from the perspective of the environmental adaptation potential has been shown.
- 3 The applicability of a follow-up method for minute disturbances caused by physical (artificial ionizing radiation in therapeutic doses: 45-71 Gy) exposition, coherently with the markers (BCL2, MDR1) of the structural disorder, has been confirmed.
- 4 Two methods supporting dynamic diagnosis and choice of therapy for PEHE have been created for the following of different state cycles. The dynamic behavior of tumor cells showing a modified state cycle in tumor progression has been investigated from the signal marker (*eg* MDR1) point of view.
- 5 As a result of the modification (a decrease in the extracellular ion concentration) of the environment or conditions (attraction domains) of tumorous and healthy cell cycles (attractors; Adh and PRLoma), they show differences in their complexity. The tumorous cultures are decompensated both in ACTH and PRL secretion.

- 6 Results gained by the investigation of the models of Adh and PRLoma attractors were extrapolated to human cases. Our hypothesis was confirmed according to the system biological approach: only the attraction domain extrapolation is possible at this time. Furthermore, it has been proven that the effects of changes of the isolated and small system elements (cell) can be compensated for, harmonized by the highly organized system (*eg* organism), but those of expansive and large system element changes cannot.

## **Melléklet javításhoz**

**Diszkrét környezeti terhelésekkel kiváltott patomechanizmusok kapcsolata  
– viselkedés zavaroktól a tumorokig**

*Ph.D. értekezés*

**Szerző:** Dr. Pálföldi Regina adjunktus

**Témavezető:** *Dr. habil. Gálfi Márta tanszékvezető főiskolai tanár*

SZTE JGYPK Környezet – Biológia és Környezeti Nevelési Tanszék

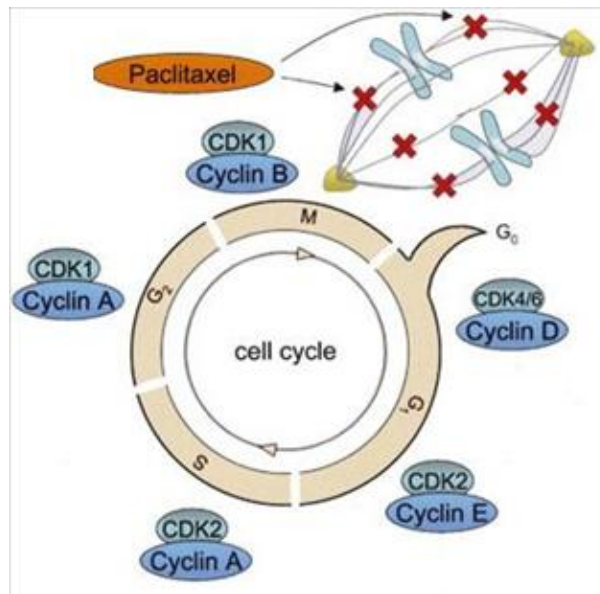
*Dr. habil. Somfay Attila tanszékvezető egyetemi tanár*

SZTE ÁOK Tüdőgyógyászati Tanszék

**SZTE TTIK Környezettudományi Doktori Iskola**

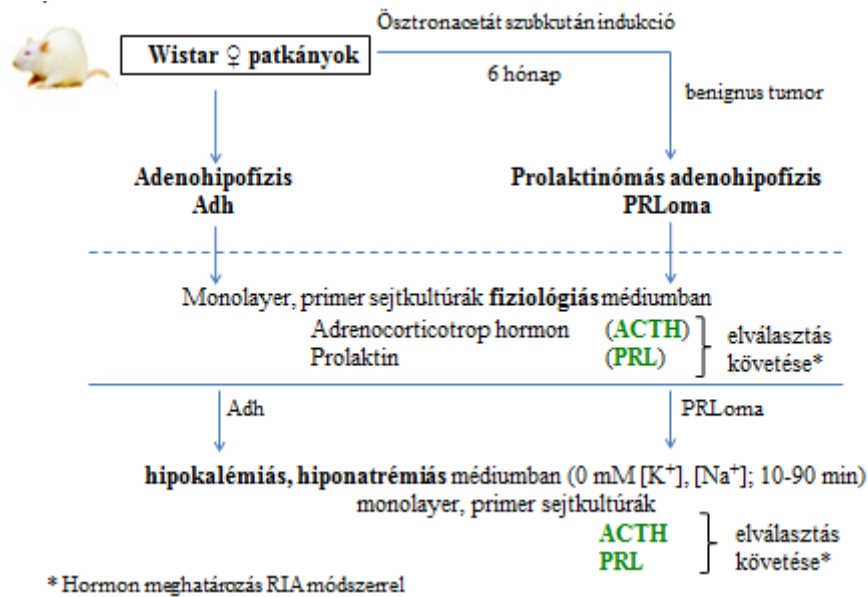
**2015**

**Szeged**

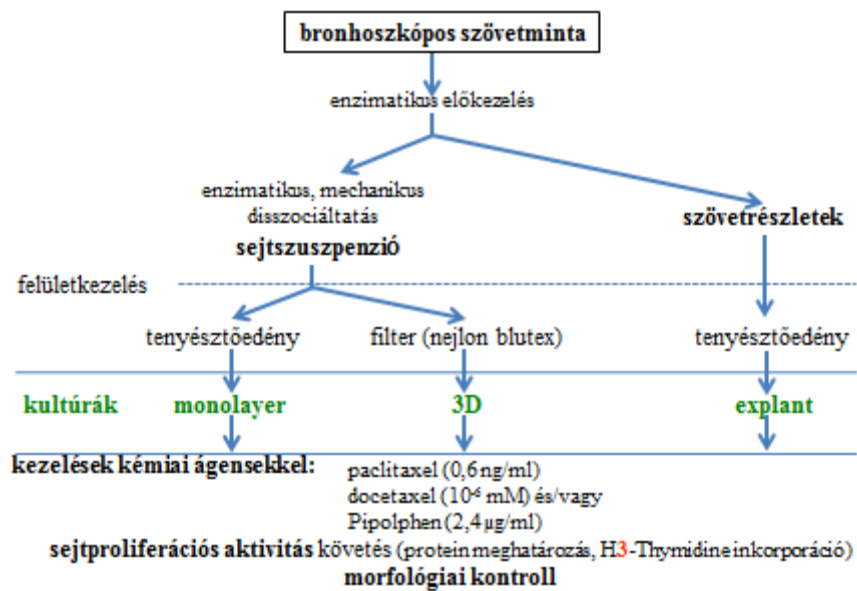


### 7.A ábra. A mitotikus orsóra ható gyógyszerek hatásmódja [38]

(R. Wessely, A. Schömgig, A. Kastrati, Sirolimus and Paclitaxel on Polymer-Based Drug-Eluting Stents Similar But Different. J Am Coll Cardiol 47(4):708-714 (2006) ábra módosításával)



### Az *In vitro* állatkísérletes protokoll bemutatása



### Az *In vitro* humán szövetminta vizsgálati protokolljának bemutatása