

Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatikai Kar
Környezettudományi Doktori Iskola
Környezet-biológia és Környezeti Nevelés Tanszék

KÖRNYEZETI FELTÉTELVÁLTOZÁSOK ÉS BIOLÓGIAI RENDSZERVÁLASZOK

Doktori értekezés tézisei

Molnár Zsolt

Témavezetők:

Dr. habil Gálfi Márta Ph.D.
habilitált főiskolai tanár

Dr. Valkusz Zsuzsanna Ph.D.
klinikai főorvos

Szeged

2015

BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

A biológiai rendszerek determinált környezeti feltételek mellett képesek működni. E rendszerek a környezetükből (pl. extracelluláris környezetükből) a belső homeosztatikus hálózatok fenntartásáért inputokat vesznek fel, melyek a rendszer alkalmazkodási mintázatait indukálják. Az élő rendszer és a környezete között fennálló állandó kölcsönhatás, illetve energia- és anyagáramlás konfidenciálisan értelmezett egyensúlya pl. a neuro-endokrin kommunikáció által valósul meg. Az emberi társadalom szükségletei és igényei kielégítése érdekében viszont a külső környezeti feltételeket tudatosan átalakította, így a tevékenységekből fakadó környezeti feltétel módosulások szükségszerűen megváltoztatták az élő rendszerek belső egyensúlyi alkalmazkodási mintázatait. Az endokrin diszruptor vegyületek (EDC) a kemizáció során létrehozott olyan xenobiotikumok, amelyek strukturális rendszerzavart okoznak a neuroendokrin kommunikáció módosításával. Az organizmus szintjén a teljes homeosztatikus vertikumot érintő hatások az anyagserehálózatok működésén át értelmezettek, így ezen hatásokért felelős vegyületeket jelen munkában *homeosztatikus diszruptor* (HD) ágensekként értelmezzük.

A neuro-endokrin rendszer a belső egyensúlyt számos szteroid típusú vegyülettel is modulálhatja. Ilyenek lehetnek az ösztrogén típusú vegyületek is, amelyek szerepe a modern társadalmakban kiemelt jelentőségű, hiszen pl. HD típusú vegyületek bomlássorozatai során melléktermékként keletkezhetnek, illetve az antikoncipiens szerek hatóanyagát is képezhetik. Nemzetközi kutatások adataiból megállapítható, hogy az ösztrogén ER α , ER β receptorokon keresztül stimulálja a PRL szintézisét és expresszióját, ezzel prolaktinómát (PRLoma) is indukálhat endokrin regulációs zavar kiváltással.

A sejt, amely extracelluláris környezetével egyensúlytartásra képes nyílt rendszer, endo-, és exocitotikus mechanizmusait az extracelluláris ion milieu-re jellemzően határozza meg. A citózisokat, mint makroállapotokat jellemzően a domináns mikroállapotok valósítják meg, mint pl. a töltésvándorlásból fakadó membrán polaritásváltozások.

Jelen munkában a célkitűzéseinket két problémakörbe csoportosítottuk:

1. Az extracelluláris ionmilieu-ben bekövetkező hipoionia által indukált regulációs sejt válaszok számos élettani folyamatban igen jelentős homeosztatikus egyensúly eltolódást iniciálnak. Az extracelluláris ionmilieu (mint környezeti feltétel) változtatásával kiváltott hipokalémia és a kapcsolt sejtszintű mechanizmusok vizsgálata során a következők voltak a célkitűzéseink:

- a. A környezeti feltételváltozások tanulmányozásra alkalmas, olyan standardizált *in vitro* modell rendszer kidolgozása, amelyben a prolaktin (PRL) és adrenokortikotrop hormon (ACTH) szekréciójának nyomon követése megvalósítható normál és belső egyensúly eltolásával kiváltott transzformált endokrin funkciók esetében.
 - b. Vizsgálatainkban az egészséges, primer monolayer adenohipofízis sejt kultúrák, hipokalémia által kiváltott sejtszintű alkalmazkodási mintázatainak értelmezése és megismerése.
 - c. Tanulmányozni kívántuk, hogy az extrém alacsonytól a fiziológiai egyensúlyi koncentrációig változó extracelluláris K^+ -milieu, miképpen befolyásolja az exocitózis mechanizmusát adenohipofízis és prolaktinomas adenohipofízis sejt kultúrákban.
 - d. Kiemelt figyelmet kívántunk fordítani annak tanulmányozására is, hogy a megváltozott szabályozással bíró transzformált sejt populációk válaszmechanizmusait miként módosíthatja a hipokalémiás extracelluláris környezet.
2. A társadalmakban a kémiai környezetterhelő ágensek nagyarányú felhasználása következtében a xenobiotikumok krónikus és/vagy akut egészségügyi hatásaival is számolni kell, ezért vizsgálatainkban célul tűztük ki a következőket:
- a. Standardizált *in vivo* és *in vitro* modellrendszer kialakítását, melyben a szubtoxikus koncentrációjú, krónikus CIB expozítor szerepe tanulmányozható.
 - b. A neuroendokrin szabályozásban esszenciális szerepet játszó ACTH release mechanizmusok HD vegyületek hatására bekövetkező modulációjának vizsgálatát.
 - c. A HD vegyületek által sejtszinten értelmezett, diszkrét energiatranszfer változások nyomon követését Mg^{2+} -dependens ATPáz aktivitásának tanulmányozásával.
 - d. A szubtoxikus koncentrációjú kombinált CIB kezelés strukturális zavarokat indukáló hatásaival morfológiai és biokémiai detektálását az adenohipofízisben.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Kísérleteinkhez leletezett hím és nőtény (a kísérletek kezdetén 200-250 g súlyú, 4-6 hetes), Wistar törzsű patkányokat használtunk (Charles River, Isaszeg, Magyarország). A kísérleti periódus alatt az állatokat kontrollált körülmények mellett (55-65 %-os relatív páratartalom, 22 ± 2 °C léghőmérséklet, 12 h nappali, 12h éjszakai megvilágítási ciklusok, 32x40x18 cm méretű ketrec, ketrecenként 5 állat) tartottuk. A kísérleti állatok számára szükséges táplálék (CRLT/N, Charles River, Magyarország) és ivóvíz *ad libitum* állt rendelkezésre.

Prolaktinóma indukció és in vitro kísérletek

Adenohipofizeális prolaktinóma indukcióhoz nőtény Wistar patkányokat (n=20) 6 hónapon keresztül subcutan kezeltünk öszttron-acetáttal (Sigma, Németország; 150 µg/ts. kg/hét).

Pentobarbital (4,5 mg/ts. kg, Nembutal, Abott, USA) anesztéziát követően a kezelt és kezeletlen kísérleti állatokat dekapitáltuk, majd az AdH és NH szöveteket preparáló mikroszkóp alatt szeparáltuk. Az AdH szövetekből enzimatis (trypsin: 0.2 % /Sigma, Németország/ 30 min-ig; kollagenáz /Sigma, Németország/: 30 µg/ml 40 min-ig; diszpáz /Sigma, Németország/: 50 µg/ml 40 min-ig, az oldatok elkészítéséhez foszfát-puffert használtunk /PBS-A/; hőmérséklet: 37°C) és mechanikus (83 és 48 µm pórusátmérőjű neylon-blutex filtert használva) disszociáltatás után primér-monolayer sejt kultúrákat készítettünk.

A funkcionális standardizálást és a bazális ACTH és PRL hormonszint meghatározást Tyrode mediumban (Sigma, Németország) is elvégeztük. Az állandó ionerősségű mediumban a $[K^+]$ -t változtattuk. A primér, monolayer sejt kultúrák hormon elválasztását 0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mM $[K^+]$ környezetet reprezentáló hipokalémiás közegben vizsgáltuk. A kezeléseket 10, 20, 30, 60 és 90 perces időpontjaiban mintákat vettünk a felülúszó mediumból. Az összegyűjtött mintákból a PRL-t radioimmunoassay (RIA), az ACTH-t immuno-chemiluminescence assay (LIA) módszerekkel határoztunk meg.

Apoptózis vizsgálata

A primer, monolayer sejt kultúrákat a fent leírt protokollnak megfelelően állítottuk elő. Az immunfestés során a mintákat 60 percig inkubáltuk anti-Bcl-2-vel (Santa Cruz Biotechnology Inc., hígítási arány: 1:25, N-19, sc-492), majd mostuk TBS oldattal, és a megkötött antitesteket 3,3'-diaminobenzidin tetra-hidroklorid (DAB, Sigma, Németország) segítségével tettük láthatóvá.

Statisztikai elemzés

A különböző $[K^+]$ kezelések normál adenohipofízisre és prolaktinómás adenohipofízisre gyakorolt hatásainak matematikai elemzéséhez ismételt méréses ANOVA módszert

használtunk. A statisztikai próbák eredményeként szignifikáns különbséget ($p < 0,001$) találtunk a vizsgált faktoroknál.

Homeosztatisz diszruptor vegyületek tanulmányozására felállított kísérleti protokoll

In vivo vizsgálati protokoll

Kísérleteinkben a hím Wistar törzsű patkányokat gasztrikus szondán keresztül kezeltük 0,1; 1,0 és 10 $\mu\text{g}/\text{ts.kg}$ dózisban hexaklórbenzol és 1,2,4-triklórbenzol (ClB) 1:1 arányú keverékével 1 ml végtérfogatban (ClB szolvenseként 0,015% etanol oldatot használtunk), 30, 60, 90 napos expozíciós időtartamban.

A standardizált kísérletfolyamban a vizsgálati állatok kapcsán felállított kísérleti csoportok:

1. Abszolút kontroll csoport ($n=5$; szondán keresztül vizet kap)
2. Stressz kontroll csoport ($n=5$; csak gyomorszondázásban részesül)
3. Pozitív kontroll csoport ($n=5$, szondán keresztül ClB szolvensét, 0,015%-os etanol oldatot kap)
4. Negatív kontroll csoport ($n=5$; nem kap kezelést)
5. A kísérleti protokollban leírt alkalmazott dózis alapján: 0,1 $\mu\text{g}/\text{ts. kg}$ dózis esetén ClB/0,1 ($n=10$); 1,0 $\mu\text{g}/\text{ts. kg}$ dózis esetén ClB/1,0 ($n=10$); 10 $\mu\text{g}/\text{ts. kg}$ dózis esetén ClB/10 ($n=10$) csoportok kerültek kialakításra.

Pentobarbital (4,5 $\text{mg}/\text{ts. kg}$, Nembutal, Abott, USA) anesztéziát követően a kezelt és kezeletlen kísérleti állatokat dekapitáltuk, majd ezt követően alvadésgátolt és natív vérmintákat gyűjtöttünk, melyből ACTH stresszhormon szintjét határoztuk meg LIA módszerrel.

In vitro experimentális protokoll

Dekapitációt követően a kezelt és kezeletlen patkányok neuro- és adenohipofízisét steril fülke és preparáló mikroszkóp alatt szeparáltuk, majd az AdH-ból a fent leírt módon, az egyes kísérleti időpontokban (30., 60., 90. napon) primér, monolayer sejt kultúrákat készítettünk. A funkcionális standardizálást követően a felülszó médiumból meghatároztuk a bazális ACTH szintet LIA módszer segítségével.

A minták fehérjetartalmát módosított Lowry-módszerrel (Lowry et al., 1951) és Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, USA) segítségével határoztuk meg.

A sejtek diszkrét energiatranszfer-változásainak követésére a Mg^{2+} -dependens ATPáz vizsgálatát alkalmaztuk módosított Martin és Doty módszerrel (Martin et al., 1949).

Adenohipofízis immunhisztokémia

A kísérleti állatokból származó hipofízis mintákból szeparáltuk az AdH-t és felszálló alkoholsorban dehidratáltuk, 4%-os paraformaldehid oldatban fixáltuk, majd paraffin blokkra helyeztük. ACTH-t expresszálo sejtek kimutatására indirekt immunhisztokémiai módszert használtunk, ehhez a metszeteket nyúl ACTH poliklonális antitestek (hígítási arány: 1:500, Phoenix Pharmaceuticals, Inc.) segítségével 12 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk. A megkötött antitesteket 0,04 %-os 4-kloro-1-naftol (Sigma, Hamburg, Németország) és Tris-HCl pufferben oldott 0,001 %-os hidrogén peroxiddal tettük láthatóvá (Sigma, Hamburg, Németország).

Statisztikai elemzés

A sejt kultúrák által released ACTH, szérumban ACTH szint, valamint a Mg^{2+} -dependens ATPáz aktivitás statisztikai elemzéséhez kétszemponyos ANOVA-t használtunk, mely szignifikáns különbséget mutatott a csoport átlagok között összességében ($p < 0,001$).

MEGBESZÉLÉS AZ EREDMÉNYEK TÜKRÉBEN

A célkitűzésekben megfogalmazottak alapján először az extracelluláris ionmilieu változásával nyomonkövetett hormonkinetikák eredményeinek prezentálását valósítottuk meg. Megvizsgáltuk az ACTH, mint stresszhormon release kinetikáját különböző extracelluláris K^+ koncentrációk függvényében, egészséges AdH sejtpopulációk esetén. Az idő függvényében a felülúszó médium hormonkoncentrációja szignifikánsan csökkent a kontroll csoporttal összehasonlítva. Ezt követően az alkalmazott $[K^+]$ expozíciók hatására bekövetkező hormonelválasztást tanulmányoztuk PRLoma sejtpopulációban. A stresszhormon elválasztásában kezdetben magasabb, majd az idő múlásával a 1,5 és 2,0 mM-os $[K^+]$ kezelést követően csökkent ACTH szintet detektáltunk. Az 1, 0,5 és 0 mM-os $[K^+]$ kezelést követően a kontroll csoporthoz viszonyítva a felülúszó médium emelkedett hormonszintjét detektáltunk. Eredményeink szerint a különböző, a magasabb K^+ koncentrációjú, de még hipoionias extracelluláris ionmilieu hatására az idő függvényében a PRL hormonelválasztás csökkenését detektáltuk normál AdH esetében, mely a sejtek adaptív képességével hozható összefüggésbe. Az alkalmazkodás a membrán hiperpolarizációjával állhat kölcsönhatásban, amely mint inhibítoros potenciál realizálódik. Hasonló összefüggéseket tártunk fel magasabb (de a homeosztatikusnál kisebb) K^+ koncentrációjú extracelluláris ionmilieu eredményeként az idő függvényében PRLoma sejtpopulációk PRL elválasztásánál.

A következőkben az egészséges és kezeletlen AdH és prolaktinomás adenohipofízis sejt kultúrák hipokalémiás közeg hatására bekövetkező PRL elválasztási kinetikáját hasonlítottuk össze. Az idő függvényében (0-90 min) a felülúszó médiumban magasabb hormonszintet detektáltunk, a kontroll csoporttal összehasonlítva. Az alkalmazkodás jelen esetben az apoptózissal, mint új állapotciklus megjelenésével értelmezhető (kaspáz emésztő enzimek következtében felbomló membrán struktúrák).

Megvizsgáltuk a monolayer sejt kultúrák anti-apoptotikus Bcl-2 protein termelését is normál és hipokalémiás közegben, mely során megállapítottuk, hogy a kezelt sejt kultúrák Bcl-2 termelése alacsonyabb volt a kontroll csoporttal összehasonlítva.

A tanulmányozott HD ágensek az extracelluláris ionmilieu módosításával közvetlen hatást válthatnak ki az érintett sejtekben, szövetekben, ugyanakkor magasabb rendszerszinteken (pl. szervezet szintjén) azonban, a visszacsatolási mechanizmusok következtében a vegyületek közvetett hatást okozhatnak. A második fő célkitűzési tématerületben a kémiai környezetterhelő ágensek hatásaira bekövetkező diszkrét egyensúlyeltolódások vizsgálatát

kívántuk megvalósítani. Az alkalmazott CIB kezelés (0,1; 1,0 és 10,0 µg/ ts. kg dózis) a kezelési időtartam függvényében (0, 30, 60, 90 nap) mind a szérum, mind a monolayer sejtkultúrák ACTH elválasztását modulálta. A kontroll csoporthoz viszonyítva az alkalmazott szubtoxikus dózisú CIB expozíciók az ACTH elválasztását fokozták a kísérleti állatokban. Hasonlóan a vizsgált dózisok a Mg^{2+} -dependens ATPáz aktivitását is szignifikánsan emelték a kezeletlen csoporttal összehasonlítva. A szövettani vizsgálatok eredményei szerint a 10 µg/ts kg dózisú kombinált CIB expozíciós kezelés után az ACTH specifikus immunreakció eredményeképpen, lényegesen intenzívebb ACTH immunpozitivitás volt megfigyelhető, a kezeletlen, kontroll csoporttal szemben.

Jelen munka konkludált következtetéseit a következőkben foglaltuk össze.

1. Hipokalémia által előidézett sejtszintű változások vizsgálatával végzett kutatásaink új információval szolgálnak.
 - a. Eredményeink alapján a kutatásainkhoz jelen munkában kialakított standardizált *in vivo* és *in vitro* vizsgálatokból jól látható, hogy a sejt és környezete funkcionális egységként determinisztikus rendszerszabályokkal jellemezhető. Igazoltuk, hogy amennyiben a sejt bekerül egy adott állapotciklusba abból nem szabadul, ahhoz adaptálódik (apoptózis, membrán hiperpolarizáció).
 - b. Az extracelluláris ionmilieu biztosítja a környezetből érkező jel-, és fenntartó inputokat, melyek az általunk feltárt mechanizmusokkal valósítják meg a sejt alkalmazkodását, mind normál, egészséges, valamint belső egyensúlyeltolással kiváltott transzformált endokrin funkciók esetében is.
 - c. Irodalmi adatok szerint különböző tumorok környezetében (az esszenciális monovalens kationok vonatkozásában) jelentős hipoionia detektálható. A bemutatott kísérleti protokoll alapján megállapíthatjuk, hogy a hipokalémia által indukált apoptotikus mechanizmus kaszkád a rendszer belső homeosztatiszta védelmi funkcióját képviseli.
 - d. Alap kutatásaink eredményeivel bemutatott válaszmechanizmusok és a kialakított modellrendszer új terápiás lehetőségek tervezéséhez járulhat hozzá.
2. A HD vegyületek közé sorolható CIB fizikai, kémiai és biológiai tulajdonságai, valamint a társadalmi vonatkozásaik következtében igen széles körben elterjedtek, így vizsgálatukra alkalmas standardizált hatásmodellt alakítottunk ki, melyben a vegyületek expozítor szerepét igazoltuk.

- a. Az extrém alacsony, szubtoxikus dózisú kombinált CLB kezelések (a leggyakoribb expozíciós útvonalat /táplálékon keresztüli kontaktus/ reprezentáló módon) a kémiai stresszorok hatására felszabaduló ACTH szintjét *in vivo* és *in vitro* módosították, amely következményesen homeosztatikus egyensúlyeltolódást indukálhat.
- b. A mechanizmus szintű eredményprezentálás során megállapítottuk, hogy az alkalmazott CLB kezelések indirekt és direkt módon is hatással vannak a biotikus rendszerekre.
- c. Jelen HD vegyületek a diszkrét energiatranszfert a Mg^{2+} -dependens ATPáz működésének fokozásával is módosítják.
- d. Krónikus, szubtoxikus CLB kezelések eredményeként az adenohipofízis szövettanában strukturális változásokat detektáltunk, amely e perzisztens szerves vegyületek proliferatív hatásával hozható összefüggésbe.

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

[1] Molnar Z, Palfoldi R, Laszlo A, Radacs M, Sepp K, Hausinger P, Tiszlavicz L, Valkusz Z, Galfi M. The effects of chronic and subtoxic chlorobenzenes on ACTH release. JOURNAL OF ENVIRONMENTAL SCIENCES (2015)

Impact factor: 1,922 (Közlésre elfogadva)

[2] Molnar Z, Palfoldi R, Laszlo A, Radacs M, Laszlo M, Hausinger P, Tiszlavicz L, Razga Z, Valkusz Z, Galfi M. The Effects of Hypokalaemia on the Hormone Exocytosis in Adenohypophysis and Prolactinoma Cell Culture Model Systems. EXPERIMENTAL AND CLINICAL ENDOCRINOLOGY & DIABETES 122: p. 575. (2014)

Impact factor: 1,760

[3] Kis GK, Ocsko T, Galfi M, Radacs M, Molnar Z, Rakosi K, Molnar AH, Laszlo F, Varga C, Laszlo FA: The effects of orexins on monoaminerg-induced changes in vasopressin level in rat neurohypophyseal cell cultures. NEUROPEPTIDES 45:(6) pp. 385-389. (2011)

Impact factor: 2,129