

A környezeti terhelések és patomechanizmusok kapcsolata

Ph.D. értekezés tézisei

Dr. Pálföldi Regina

Témavezetők:

Dr. habil. Gálfi Márta
tanszékvezető főiskolai tanár

Dr. habil. Somfay Attila
tanszékvezető egyetemi tanár

Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatikai Kar
Környezettudományi Doktori Iskola

Szeged
2015

RÖVIDÍTÉSEK

ACTH	Adrenocorticotropic Hormone
Adh	Adenohypophysis
BCL2	B-cell lymphoma 2
CIB	Klórbenzolok
EDC	Endocrine Disrupting Chemicals /Hormonháztartást Megzavaró Anyagok
MDR1	Multi drug resistance 1
PEHE	Pulmonary Epitheliod Haemangioendothelioma
PEHE M	Pulmonary Epitheliod Haemangioendothelioma - mix sejt kultúra
PEHE Tu	Pulmonary Epitheliod Haemangioendothelioma - tumor sejt kultúra
POP	Persistent Organic Pollutants/Perzisztens Szerves Szennyezőanyagok
PRL	Prolactin
PRLoma	Prolactinoma
RIA	Radio Immuno Assay
TAX	Paclitaxel/Taxol
TX	Taxane
TXT	Docetaxel

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.

Az antropogén jellegű környezeti feltételek permanens és karakterisztikus változásai expozíció függően generálnak biológiai rendszerváltozásokat. A fizikai (elektromágneses sugárzások, ionizáló sugárzások) és/vagy kémiai (endokrin diszruptor környezeti ágensek (EDC) vagy pl. az ezek modellezésére alkalmas taxánok, klórbenzol stb.) környezetterhelések már szubtoxikus dózisban is megváltozott környezeti potenciált generálhatnak.

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 alkalmazkodási potenciálnak. A viselkedés, magatartás az élő rendszerek organizmus szintű homeosztatisz folyamatainak fajra és egyedre jellemző fiziológiai következménye, amikor is az illető biológiai rendszermintázat (pl. eltérő testhelyzetek, mozdulatok stb.) módosulásait a környezet közvetlenül indukálja. Az adott fajra, egyedre jellemzően fejeződnek 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.

A viselkedés mintázatok mellett minden élőlény számos jól szervezett élettani folyamattal alkalmazkodik a környezeti feltételek (fizikai, kémiai és biológiai) változásaihoz. A környezetterhelések az emberi társadalmakhoz kötöttek. Ezért igen fontos az ember által megváltoztatott környezet, azaz a 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 magatartásmintázat változások az egészséges, homeosztatisz egyensúlyi tartományból a társas szinten kedvezőtlenül 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.

A környezeti feltételek a sejtek egészséges fiziológiai- és sejtciklus működésében, így az alkalmazkodási mintázatok kialakításában, fenntartásában esszenciálisak. Ezen folyamatrendszerek környezeti terhelésre gyulladással és transzformációs patomechanizmusokká alakulhatnak. A gyulladások során felszabaduló különböző mediátorok küszöbérték feletti jelenlétükkel kaskád eseményeket (pl. metasztázis képződés) generálhatnak. E gyulladásokból krónikus fennállás esetén pl. sejttanszformációk alakulhatnak ki.

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 (pl. tüdődaganat), melyek valójában a sejttanszformációs sejtfiziológiai zavarok csoportjába sorolt elváltozások, óriási társadalmi problémát jelentenek.

A kiváltó okok tekintetében nagy jelentőséggel bírnak azok, amelyek a belső homeosztatisz egyensúly zavarának kialakításán keresztül is (krónikus expozíciók) képesek sejttanszformációs diszfunkciókat előidézni. Ilyen hatásokat képviselnek pl. az EDC (endokrin diszruptor) vegyületek, melyek környezetünkben természetes (pl. taxánok) és szintetikus (pl. klórbenzolok) formában vannak jelen, és erősen befolyásolják szervezetünk homeosztatisz állapotát. 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 sejttanszformációt, 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. A taxánok, olyan természetes környezeti ágensek, amelyek generális sejttanszformációs mellett egyértelműen a sejtciklus szabályozását változtatják meg, ezzel alakítva át a biológiai rendszer környezeti alkalmazkodási potenciálját.

A XX. század a kemizáció évszázadaként írta be magát a társadalmunk történetébe. Sikertől számos olyan, a természet által korábban nem ismert kémiai anyagot szintetizálni (persistent organic pollutants /POP/), amelyek nagy perzisztenciával és bioakkumulációval, és ebből adódóan széles biológiai hatásspektrummal, valamint különböző toxicitási sajátságokkal jellemezhetők.

Kiemelt jelentőségű POP ágensek a halogénezett szénhidrogének, melyek között számos EDC hatású vegyületet ismerünk. 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. A klórbenzolok (CIB) az élő rendszerekre ható nagy előfordulási gyakoriságú mesterséges vegyületek, amelyek alkalmasak a környezetterhelési modellekben expozítor szerep kialakítására.

Az evolúciót meghatározó fizikai energiaformák egyrészt környezetünk természetes, másrészt a társadalmi tevékenységekből származhatnak (pl. elektromágneses sugárzások). A sugárhatás dózissal jellemzett, ennek követése a humán orvoslásban, a terápiás eljárásokhoz kötötten jól ismert és dokumentált. A sugarak hatásaira legérzékenyebbek a még nem differenciálódott, fiatal, gyorsan osztódó sejtek populációi. 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.

A környezet fizikai (sugárzások) és/vagy kémiai (EDC, POP) terhelései számos, az egyensúlytól eltérő alkalmazkodási mintázatot juttatnak kifejezésre az élő anyagformákban, így az ember esetén is. Az orvostudomány csak a kedvezőtlen eseménysorozatokat követte. 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, a ritka tumoros kórképek megjelenését érintik, pl. a PEHE (pulmonary epitheloid haemangioendothelioma) egy valós alkalmazkodási mintázat megjelenését prezentálhatja számunkra, az aktuális biológiai élő-anyagmintázat alkalmazkodási potenciáljának vesztésével vagy átalakulásával. Mivel az adott PEHE kórképek környezeti alkalmazkodási potenciállal való követésének jelentősége a terápia szempontjából hasznos, így ennek érdemes olyan markereit megtalálni, amelyek nemcsak terápiás hatékonyságukban előnyösebbek, hanem az általános biológiai mechanizmus feltárásához is közelebb visznek. 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, sejtspecifitását. Ezen túlmenően az új működési rendszer mechanizmusairól, vagy annak esetleges viselkedéséről, továbbá az epigenetikus vonatkozásokról, esetlegesen a későbbi rendszeralgorithmusok megvalósulási kockázatáról nem adnak felvilágosítást. Igen jelentős lehet tehát, az adott diszfunkciós folyamatok viselkedését jellemző dinamikus adatok megismerése.

Környezeti alkalmazkodási potenciál vesztésével egyre nehezebb az eredeti aktív biológiai rendszerállapotok és az így kiváltott homeosztatiszikus 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. Később, a permanens expozíció okán ezek a hatások egyre erősebb eltérésekkel jelzik a rendszer állapotváltozásait, pl. daganatok kialakulásával. 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 pl. extracelluláris ionmilieu, mediátorok stb.

CÉLKITŰZÉSEK

Kutatási stratégiánkban igazoltan egészséges állapotot és annak változásait (transzformált) követjük a daganatok kialakulási eseménykaszkádján keresztül olyan módon, hogy a lezajló folyamatok állapotváltozásaira (trajektória módosulásaira) találjunk jellemző markereket, keresve az ok-okozati összefüggéseket a feltétel módosulás és rendszerátalakulások között. Jelen munkában a biológiai rendszervizsgálatok tanulmányozását úgy kívánjuk megvalósítani, hogy abban a környezeti potenciált determináló külső feltételek mellett, azzal párhuzamosan a belső biológiai-rendszer-algoritmusok egyes genetikai és proteomikai jellemzőit is követjük.

Cél 1.

Környezeti szempontból jelentős hatásokat (kémiai: taxán, CIB; fizikai: ionizáló sugárzások) kívántunk modellszinten értelmezni, majd ennek megfelelően biológiai jelentőségük szerint karakterizálni.

Cél 2.

Munkánk során az expozíció választás mellett az alkalmas kutatási és vizsgálati modellek (*in vivo* és *in vitro*) kialakítása és standardizálása is feladatunk volt. Humán vonatkozások relevanciája okán, valamint a környezettudományi diszciplináris spektrum szélesítése miatt, igen fontosnak véltük a beteganyagok tanulmányozását.

Cél 3.

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.

Cél 4.

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 szerepének meghatározása.

Cél 5.

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.

Cél 6.

Az adott biológiai rendszer alkalmazkodási potenciáljának fenntartását meghatározó folyamatirányok megismerése is célunk volt.

MÓDSZEREK

***In vivo* vizsgálatok**

In vivo kísérleteinkbe leletezett Wistar (♂; ts.:300-350g) patkányokat vontunk be. Kondicionálást követően az állatokat standard műanyag ketrecben, kontrollált körülmények mellett tartottuk. A kisebb, nem rokon, 150-200g súlyú, 4-6 hetes hím Wistar patkányok kezdetektől elkülönítve, másik helyiségben voltak azonos körülmények között. Ezeket a viselkedés vizsgálatokban betolakodó állatként alkalmaztuk. A laboratóriumi rágcsáló eleség és csapvíz igényük szerint elérhető volt.

A kísérleti állatok 1:1 arányú 1,2,4-triklórbenzol és hexaklórbenzol keverékét (CIB) 1 cm³ 0,015%-os etanol vizes oldatában kapták naponta 0,1 µg/ts.kg és 1 µg/ts.kg dózisban gyomorszondán keresztül. A CIB expozíció dózisa és időtartama szakirodalmi előzmények és a kívánt céljaink megvalósítási igényei szerint kerültek kialakításra. A patkányok CIB expozíciója 30, 60 vagy 90 napig zajlott. Kontroll-rendszerünkben stressz kontrollt, abszolút kontrollt, negatív és pozitív kontroll csoportokat alkalmaztunk.

CIB expozíciókat követően a kísérleti állatcsoportoknál a szorongással összefüggő, a lokomotoros és az exploratív viselkedés elemeit az open-field teszttel, a hímek közötti agresszív viselkedést semleges ketrecben a resident-intruder tesztekkel tanulmányoztuk.

Az utolsó viselkedési tesztvizsgálat után az állatok testtömegét megmértük, azonos körülmények mellett dekapitáltuk, majd vérmintákat gyűjtöttünk a máj-toxicitás követése céljából. Emellett morfo-toxikológiai vizsgálatokat is végeztünk, a CIB okozta toxicitásra utaló jeleket monitoroztunk, és az általános morfológiai vizsgálatokat az adott szervekből származó metszetekből hagyományos szövettani festésekkel egészítettük ki. A megfelelő szervekből steril mintavétel után primer, monolayer sejt kultúrákat állítottunk elő a további *in vitro* vizsgálatokhoz.

Kutatásainkba bevont betegcsoporton a nyelőcső toxicitás értékelési eljárási protokollja szerint kívántuk követni a környezeti expozíciós modellként szolgáló mesterséges ionizáló sugárzás, nem target célú felhasználása kapcsán megjelenő hatását, melyet a nyelőcsőre vonatkoztatva mutatunk be.

***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. Munkacsoportunk által már kidolgozott hipofízis, glia és idegsejt - humán és patkány - primer, monolayer sejttenyészetek kialakításának standardizált metodikájának felhasználásával dolgoztuk ki a tüdő és tüdőtumorok sejt kultúra kialakítási módszereit. A szövetminták más részletéből explant kultúrákat készítettünk. A normál és tumoros szövetekből (PEHE) készített sejt kultúrák különböző kémiai terhelések dózis és időfüggését vizsgálva három *in vitro* modellrendszerben: (I.): ép szöveti részekből - alacsony proliferációs ráta és kontaktgátlás - ezt tekintettük kontrollnak; (II.): a tumoros klónból – térorientációs zavart mutató és kontaktgátlást veszített sejtekből - PEHE Tu; (III.): kevert: normál és tumoros sejtek - PEHE M.

Viabilitási és inkorporációs vizsgálatokat végeztünk, és meghatároztuk a fehérjetartalmat a sejt kultúrákhoz kapcsolatosan. A betegcsoportok szövetmintáiból, valamint sejt kultúrákból immunhisztokémiai vizsgálatokat végeztünk (BCL2; MDR1; CD34; CD31; Ki67; VIII.faktor; ösztrogén, progeszteron receptor).

Kémiai és fizikai expozítorok

A CIB expozítoroként történő alkalmazása során igazoltan szubtoxikus dózist használtunk mind az *in vivo*, mind az *in vitro* állatkísérletes vizsgálatok során. *Taxánok* hatásainak

vizsgálatánál a taxán-alapú kemoterápiás kezelésben (paclitaxel: TAX 175 mg/m²) részesülő betegcsoportokat vontuk be. A szövetminták is ezektől a betegektől származtak, melyeken az *in vitro* vizsgálatok folytak a megfelelő szubtoxikus dózisokban.

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 tüdőtumor volt.

Ionmilieu változás vizsgálatok

Leletezett Wistar törzsű ♀, 120-250g súlyú, 4-6 hetesek patkányok egészséges és prolaktinómás hipofíziséből (PRLoma) készítettünk sejt-kultúra modelleket. Prolaktinómás hipofízis indukálása során a standardizált körülmények között tartott kísérleti állatokat 6 hónapon át szubkutan adott ösztrom-acetáttal (150 µg/ts.kg/hét) kezeltük. A kezelés eredményeként 6 hónap alatt az állatok hipofízisében prolaktinómát detektáltunk. Kísérleteink során a médiumban csak a [K⁺] vagy [Na⁺] volt módosított, az izoállapotok (iónia, hydria, ozmózis, stb.) megtartásával. A primer sejt-kultúrák hormonelválasztását extracelluláris hipokalémiában ([K⁺]: 0 mM; n=10) és hiponatrémiában ([Na⁺]: 0 mM; n= 8) vizsgáltuk. Az expozíciós dózishatás és idősáv alapján beállított kísérleti protokoll szerint gyűjtöttük az Adh és PRLoma felülúszó mintákat, melyekből PRL és ACTH hormontartalmat detektáltuk RIA módszerekkel.

Hiponatrémia prediktív jellegének vizsgálata betegcsoporton

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

MEGBESZÉLÉS AZ EREDMÉNYEK TÜKRÉBEN

A homeosztatikus folyamathálózatban egy permanens iterálás zajlik az élő rendszerek különböző szerveződési szintjein, ahol az irányított rendszerelemek (szervrendszerek, szervek, szövetek, sejtek, sejt-közötti terek, stb.) komplex működésűek.

Az iteráló folyamatok a feltétel változások követését, azaz a környezetváltozások folyamateredmény szempontú megvalósítási sokaságának egyszerre való megjelenítését képviselik. Az az eredményes folyamatképeség, amellyel az élő egyedek a környezetük

változásaihoz képesek alkalmazkodni, az adott élő *környezeti alkalmazkodási potenciál*jaként értelmezhető hálózat.

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.

Törekedtünk arra, hogy a valós állapotokat szimuláló expozíciós események vizsgálata során kialakuló rendszerdinamikai változások (egészséges - szignifikánsan nem változott - gyulladós, (több súlyossági stádiumban) - tumoros) követésére alkalmas modelleket tervezzünk, építsünk ki és standardizáljunk. Fontos kutatási kritériumnak tekintettük, hogy olyan vizsgálati módszereket alakítsunk ki standardizáltan, amelyekkel szubtoxikus dózistartományokban észlelhető változásokat is követhetünk.

A szubtoxikus dózisu környezeti hatások tanulmányozására *in vitro* (sejtkultúrák) és *in vivo* rendszereket alakítottunk ki. Különös figyelmet igényelt a humán vizsgálatok esetén a betegcsoportok olyan módon való kiválasztása, hogy a statisztikai szempontú minta-elemzési követelmények biztosítottak legyenek.

Az egyedszintű EDC hatású, de igazoltan szubtoxikus koncentrációban alkalmazott ClB pszicho-neuro-endokrin- rendszerre gyakorolt hatásainak tanulmányozására viselkedés vizsgálatokat állítottunk be. Olyan kontroll rendszert alakítottunk ki, ahol a különféle kontrollcsoportok közötti eltéréseket keresve statisztikai elemzéseket végeztünk. Megállapíthattuk, hogy sem szignifikáns, de még trend jellegű eltéréseket sem tapasztaltunk a kontroll csoportok között, így a további 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 µg/ts.kg), krónikus ClB kezelés hatására mind az agresszióval, mind a szorongással összefüggésbe hozható viselkedéselemek kifejeződése 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 sem prezentálta minden vizsgált viselkedésmintázatban a vázolt eltérést. Ez az eredmény azt sugallja, hogy 0,1 µg/ts.kg expozíciós ClB dózis alkalmazása esetén már közelítünk a hatásküszöbhez az agresszív viselkedés elem követése kapcsán. Így megállapítható, hogy az alkalmazott, igazoltan szubtoxikus dózisu ClB kiválthat olyan, a források megszerzésére irányuló hátrányos magatartásmintázatot, 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.

Amikor a mesterséges ionizáló sugárzást a sugárterápia során igazoltan standardizált és rögzített körülmények között alkalmazzák, akkor annak apoptózist indukáló hatását a célterületen nézzük. Viszont a sugárzásnak olyan területeken is jelentkezik a hatása, amelyet terápiásan nem céloznak. Ilyenkor tehát detektálhatóan, szubtoxikus dóziséű ionizáló sugárhatás következik be. A tüdőcarcinómák célzott sugárkezelése kapcsán a nem célzott nyelőcső területen kialakuló hatások követésére nyílt lehetőség, amelyekkel a gyulladáso folyamatok kiváltásának biztosítása mellett annak progresszióját is követhettük. Megállapítottuk, hogy a nyelőcső sugárhatással kiváltott elváltozásai és a dózis-volumen paraméterek között összefüggés van.

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

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: +; CD34 és VIII faktor antigén vesztést észleltünk, ami ösztrogén és progeszteron receptor negativitással és az MDR1 protein erős jelenléttel (2+), és alacsony BCL2 intracelluláris szinttel párosult. Ennek ismeretében *in vitro* modelleken végzett különféle tumor-kezelésben alkalmazott ágensek hatásait tanulmányoztuk (pl. vinorelbine; carboplatin; docetaxel; paclitaxel) a biztos terápia érdekében. Az alkalmazott *in vitro* modellvizsgálat lehetőséget biztosított a tartós, több generációs sejtkultúrákon zajló dinamikus sejtviselkedések tanulmányozására is.

Korábbi kutatásainkból plazmid-törlő hatásáról ismert prometazint is bevontuk vizsgálatainkba. Eredményeink szerint a prometazin jelenlétében még hatékonyabban sikerült a PEHE kultúrák - általunk kiválasztott taxán (paclitaxel) jelenlétében - szignifikánsan

csökkent sejtproliferációját visszاسzorítani. A 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 prometazin MDR1-t gátló hatása, hiszen *in vitro* továbbkezelés docetaxel (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. 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 és azon, mint feltételen értelmezett rendszer dinamikus együttműködését 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. Természetesen a strukturális zavarok (pl. krónikus kémiai expozíciók által kiváltottak) az adott állapotciklus szempontjából az érintett szerveződési szintek szerint reverzibilisek vagy irreverzibilisek lehetnek. Mivel az orvostudomány adatbázisa ebben a kérdéskörben igen jelentős, ennek a felhasználása és bővítése is indokoltá tette vizsgálatainkba a betegcsoportok bevonását. Ugyanakkor 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 dekompenzálttság 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 állapotciklussal bíró sejtek tumoros struktúrát és folyamatrendszert mutatnak. Az extracelluláris ionmilió diszkrét eltolódása a tumoros sejt esetén pont az állapotciklus stádiumainak meghatározásához nyújthat segítséget. 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 során, melyek a sejtek lokális környezetének és a sejtfunkciók 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.

Dolgozatunkban kitűzött célunk volt a *környezeti alkalmazkodási potenciál* vizsgálata, mely fogalmat ezen 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.

ÖSSZEFOGLALÁS

Új eredmények

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. Igazoltá 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 ismeretünk 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.

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.

Ph.D. TÉZIS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ CIKKEK

1. **R. Palfoldi**, M. Radacs, E. Csada, Z. Molnar, S. Pinter, L. Tizslavicz, 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).

Impact faktor: 1,148

2. A. Maráz, J. Furák, Z. Varga, E. Fodor, Z. Együd, E. Borzási, Z. Kahán, **R. Pálföldi**, L. Tizslavicz 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).

Impact faktor: 1,872

3. A. Maraz, J. Furak, **R. Palfoldi**, J. Eller, E. Szanto, Z. Kahan, L. Thurzo, J. Molnar, L. Tizslavicz 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).

Impact faktor: 1,725

4. Z. Molnár, **R. Pálföldi**, A. László, M. Radács, M. László, P. Hausinger, L. Tizslavicz, Z. Rázga, Z. Valkusz and M. Gálfí, *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).

Impact faktor: 1,76

5. **R. Palfoldi**, M. Radacs, E. Csada, Z. Rozsavolgyi, L. Tizslavicz, A. Somfay and M. Galfi, *Primary pulmonary epithelioid haemangioendothelioma*. Orv hetilap 152(21):834-9, (2011).

6. Z. Valkusz, G. Nagyéri, 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 Behavior 103(5):421-430, (2011).

Impact faktor: 2,869

Ph.D. TÉZISSEL KAPCSOLATOS POSZTER- ÉS ELŐADÁS KIVONATOK

1. **Pálföldi R**, Radács M, Csada E, Rózsavölgyi Z, Tizslavicz L, Valkusz Zs, Somfay A, Molnár J, Gálfi M, *Antitumor treatment of pulmonary epitheloid haemangioendothelioma – after in vitro tumor cell cultures experiments*. In: 22nd International Congress on Anti-cancer Treatment. Konferencia helye, ideje: Paris, France, 2011.02.01-2011.02.04. *Paper IC/AB1171*.
2. **Palfoldi R**, Radacs M, Csada E, Rozsavolgyi Z, Tizslavicz L, Valkusz Z, Somfay A, Molnar J, Galfi M, *Antitumor treatment on pulmonary epitheloid hemangioendothelioma*. *Journal of Thoracic Oncology* 6 (6) pp. S1523-S1524, (2011).
3. **Pálföldi R**, Csada E, Rózsavölgyi Z, Tizslavicz L, Gálfi M, Somfay A, *Pulmonary epitheloid hemangioendothelioma*, In: Zsolt Pápai-Székely (szerk.), 16th World Congress for Broncholgy. Konferencia helye, ideje: Budapest, Magyarország, 2010.06.13-2010.06.16. *Paper A-0169*.
4. **Pálföldi R**, Csada, E, Rózsavölgyi Z, Tizslavicz L, Gálfi M, Somfay A, *Terápiás megoldások támogatása in vitro módszerek fejlesztésével*. *Medicina Thoracalis* (Budapest) 63: p. 217, (2010).
5. **Pálföldi Regina** et al.: *Pulmonalis epitheloid haemangioendothelioma*. In: Magyar Bronchológus Egyesület konferenciája. Konferencia helye, ideje: Pécs, Magyarország, 2009.10.09-2009.10.10.
6. **Pálföldi R**, Szalontai K, Csada E, Furák J, Tizslavicz L, Somfay A, *A hyponatraemia kissejtes tüdő tumoros betegeinkben*. In: A Magyar Tüdőgyógyász Társaság Onkolulmonológiai Szekció és a Magyar Bronchológus Egyesület konferenciája. Konferencia helye, ideje: Szeged, 2014.10.09.-11.