

**Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola**

**A reaktív vegyületek és a negatív energiamérleg hatása az
apoptózis és a nekrozis kialakulására**

PhD értekezés tézisei

Dr. Domokos Mónika

2010.

Témavezető és témabizottsági tagok:

Prof. Dr. Gálfi Péter
SZIE-ÁOTK Gyógyszertani és Méregtani Tanszék

Dr. Neogrády Zsuzsa
SZIE-ÁOTK Élettani és Biokémiai Tanszék

Dr. Jakus Judit
MTA Kémiai Kutatóközpont

.....
Dr. Domokos Mónika

Bevezetés és célkitűzések

A humán eredetű colorectális adenocarcinoma differenciálatlan sejtjei jól modellezik a vastagbél daganatosan transzformált hámsejtjeinek tulajdonságait. Az általunk is használt szülői HT29 vonalból a tartós tenyésztés során további törzseket izoláltak: a HT29-12 és a HT29-21 metothrexátra és 5-fluorouracilra rezisztens szubklónokat. A HT29 vonalak különféle külső hatásra – például glükóz megvonás, butirát kezelés – differenciálódni képesek.

A butirát indukálta proliferáció gátlás, sejtleválás és sejthalál területén végzett vizsgálataink során nekünk is sikerült egy stabil HT29 szubklónt izolálnunk, mely feltűnően különbözően viselkedett a szülői HT29 törzstől a butirát indukálta sejt differenciáció szempontjából, de igen érzékeny volt a butirát hatására kialakuló sejtleválásra és sejthalálra. Ezt a HT29R sejt vonalat modellként használtuk fel, hogy megvizsgáljuk a butirát hatására meginduló szabadgyök, illetve ROS termelést, összefüggésben a differenciációval és a sejthalállal. Számos tanulmány leírta már, hogy a daganatos sejtekben butirát, illetve más hiszton-deacetiláz inhibitorok által kiváltott sejthalál kapcsolatban van a ROS szint emelkedésével. Mindazonáltal a ROS ezen folyamatokban betöltött szerepe máig tisztázatlan. A tenyésztett vastagbélhámsejtek millimoláris butirát koncentrációval való kezelése hiszton-acetilációt vált ki, ezáltal a génexpresszió megváltozása, a proliferáció gátlása, a sejtciklus leállása, valamint differenciáció és a sejthalál indukciója következik be.

Kísérleteink célja az volt, hogy összefüggést találjunk a különböző redox paraméterek és a butirát indukálta differenciáció, sejtleválás, valamint sejthalál között azáltal, hogy összehasonlítjuk a differenciációra nem hajlamos, de erősen sejthalál-érzékeny HT29R sejt vonalat a differenciációra hajlamos és jóval kevésbé sejthalál-érzékeny HT29-12 és HT29-21 szubklónokkal. Ennek érdekében először meghatároztuk a butirát hatására kialakuló proliferációgátlást,

differenciációt, sejtleválást és sejthalált a HT29R és HT29-21 sejteken. Meghatároztuk (i) a butirát koncentráció függvényében kialakuló intracelluláris szabadgyök szinteket ESR spektroszkópiával, (ii) a ROS kialakulást DCF (2,7-dichlorofluorescein-diacetate) oxidációval, (iii) a H_2O_2 termelést fenolvörös módszerrel, (iv) a GSH/GSSG arányt és (v) a redoxpotenciált. További célunk volt feltárni, hogy a differenciációra nem hajlamos HT29R sejtek jellemezhető-e redox tulajdonságaik alapján. Végül leírtuk, hogy HT29R sejteken miként alakul a butirát indukálta sejthalál az 1,5-dihidroxi-izokvinolin (DHQ), rezveratrol illetve ciklosporin-A (CsA) jelenlétében.

Vizsgálataink másik fő területét a méretében és tömegében is megnövekedett vemhes méh ellés utáni fiziológiás átépülése, az involúció, vizsgálata adta. A sejtek apoptózissal való pusztulása jelenti a szöveti leépülés központi elemét, hiszen ez lehetővé teszi, hogy a sejtek szétesése nélkül történjék meg a szövet lebontása, mely így nem indukál gyulladást a környezetében.

Az ellés utáni időszak megnövekedett energiaigénye elsősorban a meginduló laktációval magyarázható, miközben ezzel párhuzamosan a tehenek takarmányfelvétele nem növekszik arányos mértékben. Ezt súlyosbítja továbbá a méhinvolúció energiaigénye, hiszen a szöveti leépülés során a szervezet számára előnyösebb sejthalál, az apoptózis szintén energiaigényes folyamat. A foszfatidil-szerin transzlokáció a membránban, a kaszpáz kaszkád enzimrendszer működése, a kialakuló DNS fragmentáció és a DNS darabokat magukba foglaló apoptotikus testek létrejötte egyaránt ATP-t igényel. A DNS darabolódása ezeken túl egy javítómechanizmust, a PARP (Poli-ADP-ribóz-polimeráz) enzimet is aktiválja, mely nagy mennyiségű ATP felhasználásával igyekszik a genetikai anyag sérüléseit helyrehozni, amíg a kaszpáz-3 enzim el nem hasítja azt.

Második kísérletsorozatunk célja az volt, hogy az involúció korai szakaszában gyűjtött tehén uterus-bioptátumokból készült metszeteken tanulmányozzuk: milyen összefüggés áll fenn az állatok energia-állapota és az apoptózist mutató sejtek aránya között. Azt feltételeztük, hogy a szervezet energiahányos állapotát jelző hyperketonaemia sejtszinten ATP hiányban nyilvánul meg, ami befolyásolja a sejthalál kialakulását. Mivel az apoptózis energiahányos állapotban zavart szenvedhet, nagyobb mértékű nekrozis alakulhat ki, ami növelheti a gyulladásos folyamatok előfordulásának gyakoriságát.

Anyag és módszer

Az első kísérletsorozatban alkalmazott HT29-ből származó HT29R, HT29-12 és HT29-21 tenyészeteket DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) tápfolyadékban tenyésztettük 37°C-on, 5% CO₂ tartalmú, párásított levegőjű tenyésztőkamrában. Különböző butirát koncentrációkkal 24 vagy 48 órán át kezelve a sejteket vizsgáltuk azok válaszát az adott kezelésre.

A sejtosztódás mértékének meghatározásához az élő sejteket redukáló képességük alapján kimutató 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboximetoxifenil)-2-(4-szulfófenil)-2H-tetrazolium só (MTS) alkalmaztunk. A sejteket 96 lyukú lemezen tenyésztve vizsgáltuk, hogy a különböző butirát koncentrációk hogyan befolyásolják a sejtek osztódását.

A sejtleválás mértékét úgy határoztuk meg, hogy a 25 cm²-es tenyésztőedényekben növesztett tenyészetekben összehasonlítottuk az összegyűjtött levált illetve a letapadt majd tripszinezett sejtek protein mennyiségét. A sejtleválás meghatározására alkalmaztuk a Giemsa festést is, amelynek során a 96 lyukú lemezekben az aljzatra letapadt sejteket 30 percig festettük vízes 50%-os Giemsa oldattal.

A sejthalál meghatározásához a Nicoletti-féle módszer szerint propidium-jodiddal megfestett sejteket vetettük alá FACS analízisnek és vizsgáltuk a sejthalálra jellemző sub-G1 fázisban lévő sejtek arányát. Az apoptózis és nekrozis elkülönítésére a sejteket 10 percig 2,5 µg/µl propidium-jodid és/vagy 2,5 µg/µl Hoechst 33258 festékekkel kezeltük, majd AxioCam digitális kamerával és színes szűrőkkel kiegészített fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk és fényképeztük.

Az apoptózis kimutatására a TUNEL próbát alkalmaztuk, mely a DNS fragmentációt mutató sejtek jelzésére képes. Ennek eredményeként az apoptotikus sejtek DNS-e FITC-cel jelölődik, majd egy FITC specifikus ellenanyagot használtunk a fluoreszcencia intenzitásának növelésére. Az

apoptózis láthatóvá tételére színes szűrőkkel kiegészített fluoreszcens mikroszkópot alkalmaztunk.

Az apoptózis másik módszerrel történő meghatározásához a DAPI festést követően a sejtmag morfológiai vizsgálatát, míg a nekrozis kimutatására a sejtek tripánkék felvételi tesztjét végeztük el.

A sejtdifferenciáció indikátoraként az alkalikus-foszfátáz aktivitást vettük figyelembe. Az enzimaktivitás meghatározására foszfát szubsztrátként p-nitrofenil-foszfátot alkalmazó ALP tesztet használtuk.

A szabadgyök, illetve a GSH/GSSG meghatározásához a sejtenyészeteket 25 cm²-es tenyésztőedényekben növesztettük, majd 48 órás butirát kezelésnek vetettük alá. A kontroll és a kezelt sejteket szuszpenzióját egyaránt folyékony nitrogénben tároltuk a további mérésekig. A szabadgyökök koncentrációjának mérése egy X-sávós ESR spektrométerrel történt a MTA Kémiai Kutatóintézetében.

A reaktív oxigén vegyületek méréséhez a sejteket 100 mm átmérőjű petricsészékben növesztettük 24 óráig, majd az adott butirát koncentrációval kezeltük 48 órán keresztül. Ezután a tápfolyadékhoz diklorofluoreszceint (DCF) adtunk. A reaktív oxigén vegyületek képesek átalakítani a DCF-et annak egy fluoreszcens származékává.

A H₂O₂ termelés kimutatása kisebb módosításokkal Baud módszere, az ún. fenolvörös módszer szerint történt. A sejtekhez a fenolvörös nátrium-sóját valamint mieloperoxidázt adtunk, majd az oldat lúgosítása után leolvastuk a keletkezett komplex abszorbanciáját.

A redukált glutation meghatározása a lúgos környezetben szulfhidril-csoportokkal reakcióba lépő Ellman-reagenssel történt, amely egy vízdékony komplexet alakít ki a glutationnal.

Második kísérletsorozatunkban Magyarország keleti részén található 7 nagyüzem összesen 49 állata vett részt. A 2-8 éves Holstein-fríz teheneket az

ellés utáni 4-14. napon klinikai vizsgálatnak vetettük alá, amely alapján az egyedeket puerperalis metritis-szel terheltnek vagy egészségesnek minősítettük. A *Vena jugularisból* vért vettünk, amelyekből meghatároztuk a vér ketonanyag koncentrációját. Az állatokból az ellés utáni 4-14. napon endometrium biopsziát vettünk melyeket fixálás után paraffinba ágyasztunk.

A biopsziás mintákban az apoptózis meghatározására kettős immunfestést alkalmaztunk: a leukocyták megfestése a közös leukocyta antigén alapján történt (common leukocyte antigen, CLA vagy CD45) míg az apoptózisra jellemző töredezett DNS kimutatása a TUNEL jelöléssel. Háttérfestésként valamennyi sejtmagot a fluoreszcens DAPI-való festéssel tettünk láthatóvá. Az így kapott mintákat AxioCam digitális kamerával kiegészített fluoreszcens mikroszkóppal efényképeztük.

Az endometrium összes sejtszámát megkaptuk (csak hám és kötőszöveti sejteket figyelembe véve), ha a mezőnként számolt DAPI-val festődött sejtek számából kivontuk a CD45 pozitivitást mutató leukocyták számát. TUNEL-pozitív sejtek egyidejű DAPI festődéssel adják meg az apoptotikus sejtek számát.

Eredmények

A vastagbélhámsejtekben lezajló differenciáció egyik legfontosabb markere az alkalikus-foszfatáz aktivitás. Az alkalikus-foszfatáz aktivitás mindkét differenciációra hajlamos sejtvonal, a HT29L és a HT29-21, esetében is szoros koncentrációfüggést mutatott a kezeléshez alkalmazott butirát mennyiségével az 1-10 mM közötti tartományban.

A következőkben összehasonlítottuk a butirát koncentráció függvényében előidézett proliferációgátlást (MTS-teszttel) és sejtleválást (Giemsa-festéssel) a HT29R és HT29-21 sejteken. Eredményeink szerint a HT29R sejtek fokozottan érzékenyek a butirát által előidézett növekedésgátlásra és sejtleválásra egyaránt.

A következő lépésben megvizsgáltuk a HT29R és HT29-21 sejtek érzékenységét a butirát által kiváltott sejthalállal szemben, valamint felmértük az így kialakuló sejthalál típusát is. A tenyészetek 10 mM butirát kezelését követően a HT29R sejtek 84,6%-a volt a sub-G1 fázisban, míg ugyanez a HT29-21 sejtek esetében csak 8,9%-nak adódott. Az eredmények szerint tehát a butirát által előidézett differenciációnak ellenálló HT29R sejtek erősen érzékenyek a butirát indukálta sejthalálra, míg hasonló körülmények között a HT29-21 sejtek annak gyakorlatilag ellenállnak.

Ezek után a Hoechst 33285 festékkel, illetve a propidium-jodiddal festett sejtek mikroszkópos képeit hasonlítottuk össze. A Hoechst megfesti az élő és elpusztult sejtek magját is, míg a hidrophil propidium-jodid kizárólag a már sérült membránon képes átjutni, tehát csak a már nekrozisban lévő sejteket festi meg. Eredményeinkből az következik, hogy a HT29R sejtek leválásra való fokozott érzékenysége a sejthalállal szembeni nagyobb érzékenységgel párosul.

A következőkben azt szeretnénk volna feltárni, hogy az eddig vizsgált, butirát által kiváltott hatások összefüggésben állnak-e a sejtekre jellemző redox állapot változásaival.

A HT29-12 és a HT29-21 sejtek esetében a GSH/GSSG arányban csupán nem szignifikáns mértékű változásokat tapasztaltunk. A HT29R vonal esetében azonban egy butirát koncentráció-függő GSH/GSSG csökkenést tapasztaltunk. Hasonló eredményeket kaptunk a redoxpotenciál értékében is, ahol a HT29R sejtek esetében a 2-3 mM butirát koncentrációnál szignifikáns visszaesés történt.

A butirát koncentráció függvényében jelentős mértékű szabadgyökszint növekedés volt tapasztalható a HT29R sejteken, míg a HT29-12 és HT29-21 vonalakon egyáltalán nem mértünk szabadgyökszint változást a teljes vizsgált butirát koncentráció tartományában.

HT29R sejteken a butirát koncentráció függvényében jelentős mértékű ROS/RNOS képződés indult meg, míg a HT29-12 és a HT29-21 sejtek esetében csak minimális emelkedést tapasztaltunk.

Egy, a 2 mM butirát koncentrációtól kezdődő, jelentős mértékű koncentrációfüggő H_2O_2 képződés volt mérhető a HT29-12 és HT29-21 sejteken, ugyanakkor nem volt statisztikailag értékelhető változás a H_2O_2 szintjében a HT29R sejteken a teljes butirát koncentráció tartományt tekintve.

Az előzőekben kapott eredmények felvetik a kérdést, hogy vajon a butirát hatására kialakuló szabadgyök és/vagy ROS/RNOS képződés kapcsolatba hozható-e a sejtleválással. A HT29-21 sejtvonalból származó sejteknél érdemi ROS/RNOS és szabadgyök termelődés nélkül megy végbe a sejtleválás. Mindez egyértelműen azt mutatja, hogy nincs kapcsolat a ROS/RNOS és a szabadgyök termelődés, valamint a sejtleválás mértéke között.

HT29R sejteken a butirát koncentráció függvényében kialakuló sejtleválás, valamint a ROS/RNOS termelés hasonló mintázatot mutat ugyan, a leválás azonban már alacsonyabb butirát koncentrációnál megkezdődik, mint a ROS/RNOS termelés. A szabadgyök képződés és a sejtleválás viszont azonos butirát koncentrációnál kezdődik meg, a korrelációt itt tehát nem lehet kizárni.

További vizsgálataink során felmértük a HT29R sejteken a butirát hatására kialakuló sejthalált különböző vegyületek jelenlétében. Felvetettük a kérdést, hogy miként alakul az apoptózis és/vagy a nekrozis mértéke dihidroizokvinolin (DHQ), rezveratrol, valamint ciklosporin-A (CsA) alkalmazásakor. A DHQ a poli-ADP-ribóz-polimeráz gátlójaként, a rezveratrol antioxidáns tulajdonságú polifenolos fitostilbénként, míg a CsA a mitokondriális membrán „transition pore” nyitásának gátlójaként képes befolyásolni a sejthalált. A HT29R sejteken 20 mM butirát hatására főként nekrozis alakul ki. Ugyanakkor mindhárom vizsgált vegyület, a DHQ, a rezveratrol vagy a CsA jelenléte esetén a sejthalál típusa túlnyomóan apoptotikussá válik.

Az apoptózis másik technikával való kimutatásához a TUNEL módszert valamint a hasított PARP kimutatását alkalmaztuk a butiráttal és DHQ-val kezelt HT29R sejteken. Az önálló butirát kezelés hatására a sejtmagok megnagyobbodtak, jelezve ezzel a nekrozist. A butirát mellett alkalmazott DHQ jelenlétében azonban a sejtek nagy része apoptózisban pusztult el. A TUNEL-próba tehát megerősítette a mikroszkópos elemzés során nyert eredményeket.

Az *in situ* végzett másik kísérletsorozatunkba bevont állatokat klinikai paramétereik alapján négy csoportba osztottuk aszerint, hogy puerperalis metritis (PM) került-e megállapításra, ill. a vér ketonanyag szintje 1,0 mmol/l β -hidroxi-butirát (BHB) szintnél magasabb (hyperketonaemia) vagy alacsonyabb (normoketonaemia) értékkel volt-e jellemezhető: (1) kontroll, (2) PM, normoketonaemia, (3), egészséges méh, hyperketonaemia (4) PM, hyperketonaemia. A méhbiopsziákhoz paraffinba ágyazott metszetek készültek, melyekből elsőként hematoxin-eozinnal festett metszeteket készítettünk az előzetes szövettani értékelés céljából. A biopsziás minták szövettani értékelését követően számos egyed (n = 25) ki kellett zárni a további értékelésből a szövetminta erős degenerációja vagy hámhiányos állapota miatt.

Az egészséges kontroll csoportba 10 tehenet soroltunk, a vérükben mért BHB koncentráció $0,45 \pm 0,12$ mmol/l volt. Ezekből az állatokból nyert biopsziás mintákban az összes sejt $49,97 \pm 6,18\%$ -a mutatott TUNEL-teszttel apoptózist.

A PM, normoketonaemiás csoport vérmintáiban mért átlagos BHB koncentráció $0,42 \pm 0,15$ mmol/l volt. Az apoptózis előfordulási aránya $51,67 \pm 0,15\%$ volt az endometrium mintákból készített metszeteken.

A hyperketonaemiás csoport egyedeiben az átlagos BHB koncentráció $1,47 \pm 0,32$ mmol/l volt. Az apoptózis mértéke a vizsgált állatokban $23,83 \pm 6,44\%$ -nak adódott.

Ha az állatokat a vérplazma BHB koncentrációja alapján normo- illetve hyperketonaemiás csoportokra osztjuk, akkor az egyes csoportokhoz tartozó apoptózis indexek alapján, amelyek $50,82 \pm 4,76\%$ -nak illetve $23,83 \pm 6,44\%$ -nak adódtak, szignifikáns különbség látható ($p < 0,05$) a két csoport értékei között.

Megbeszélés

A sejtek differenciációja alternatív utat jelent a folytonos sejtosztódással vagy a sejthalállal szemben. Ez arra utal, hogy a proliferáció, a differenciáció és a sejthalál folyamataiban van egy közös pont, amelyen keresztül az egyik folyamatból át lehet térni a másikba.

Saját vizsgálatunkban a butirát koncentráció függvényében kialakuló fokozott H_2O_2 termelődést tapasztaltunk a differenciációra érzékeny HT29-12 és HT29-21 sejteken, de érdekes módon emellett a szabadgyökök vagy ROS/RNOS vegyületek szintjének emelkedése nem volt detektálható. Ezzel ellentétben a differenciációnak ellenálló HT29R sejtek éppen ellenkezőleg viselkedtek: a butirát koncentráció függvényében fokozott szabadgyök és ROS/RNOS képződés indult meg bennük, de jelentősebb mértékű H_2O_2 termelődés nélkül. Ennek alapján szelektív módon társíthatjuk a különböző ROS vegyületeket a következményesen kialakuló sejthalálhoz vagy differenciációhoz, feltételezve ezzel, hogy azok szignál molekulaként működnek a sejthalál és differenciáció közötti válaszáton.

Az a tény, hogy HT29R sejtekben a teljes butirát koncentráció tartományban csekély szinten maradt a H_2O_2 képződés, míg a butirát kiváltotta sejthalálra kevésbé érzékeny HT29-12 és HT29-21 esetében koncentrációfüggő mértékben termelődött, azt feltételezi, hogy a H_2O_2 nem játszik meghatározó szerepet a sejthalál jelátvitelében.

HT29-12 és HT29-21 sejtekben a termelődő H_2O_2 koncentráció teljes tartományában a GSH/GSSG arány és a hozzá tartozó redoxpotenciál értékek nem változtak, jelezve ezzel, hogy a H_2O_2 képződés, a vizsgált idő intervallumon belül, nem vált ki oxidatív stresszt, de kapcsolatba hozható a sejthalállal szembeni ellenállással és a differenciáció-érzékenységgel.

A HT29R sejtekben azonban az 1 mM, illetve az 5 mM butirát koncentráció felett kiváltott szabadgyök és ROS/RNOS termelés összefüggést mutat a sejtbeli GSH/GSSG arány csökkenésével és a redoxpotenciál változásával. Vizsgálatainkban tehát a HT29R sejtekben mért, butirát által kiváltott FR és ROS szintek oxidatív stresszt és egyidejűleg sejthalál-érzékenységet is kiváltottak.

A butirát által kiváltott sejthalált tekintve csak a HT29R vonalon figyeltünk meg nekrozist/késői apoptózist, de a DHQ, a rezveratrol vagy a CsA jelenlétében ez túlnyomórészt apoptózisba ment át. Jelen vizsgálatainkban a butirát hatására megnövekedett ROS/RNOS szintek megerősítik azt a tényt, hogy az oxidatív stressz központi szerepet játszik a butirát által kiváltott sejthalálban. Az azonban még tisztázatlan maradt, hogy mely ROS/RNOS vegyületek termelődnek butirát hatására, és ezek háttérében milyen mechanizmus(ok) áll(nak).

Második kísérletsorozatunkban azt tapasztaltuk, hogy azoknál az egyedeknél, ahol a szervezet energiaegyensúlya tartósan meghaladta a még fiziológiásnak tekinthető hiány mértékét, a számos energiaigényes folyamat között az involúció is zavart szenved. Mivel az involúció egyik fontos eleme az energiaigényes apoptózis, ezért feltételezhetően a programozott sejthalál sem játszódhat le akadálymentesen. Feltételezéseinknek megfelelően azt az eredményt kaptuk, hogy az energia ellátás zavara, vagyis ketonaemia esetén csökken az apoptózissal elpusztuló endometrium sejtek száma. Ez az érték vizsgálatainkban $23,83 \pm 6,44\%$ -nak adódott.

Vizsgálataink eredményei azt mutatták, hogy a kontroll állatokhoz viszonyítva a hyperketonaemiás egyedek méhbiopátumaiban az össz-sejtszámhoz viszonyítva százalékosan kevesebb az apoptotikus sejtek aránya. Az energiaigényes apoptózis tehát tartósan fennálló és jelentős mértékű negatív energiaegyensúly kialakulásakor zavart szenved. Eredményeinkből arra

következtethetünk, hogy NEB esetén az endometrium sejtjei kisebb arányban pusztulnak el apoptózissal, ami fokozhatja a nekrozis veszélyét és a gyulladásos folyamatok kialakulását.

A tehenek megfelelő energiaellátása a puerperium időszakában tehát nemcsak az elégséges tejtermelés miatt fontos tényező, hanem a méh fiziológiásan lezajló involúciója szempontjából is. Ha ugyanis elegendő energia áll a szervezet rendelkezésére, akkor az endometrium le- és átépülése során megfelelően fel tudnak szívódni, illetve el tudnak távozni a külvilág felé az elhalt szövetek. A gyorsan és szabályosan végbemenő involúció ugyanis a legfőbb biztosíték arra, hogy a méh ne jelentsen táptalajt a baktériumok túlzott elszaporodásához, vagy esetleg patogén fajok megtelepedéséhez, vagyis a puerperalis metritis kialakulásához.

Új tudományos eredmények

Kísérleteimben számos HT29 sejt vonalon *in vitro* vizsgáltam a butirát hatását, egyes szabadgyökök és a ROS vegyületek keletkezését, valamint az ezek között fennálló esetleges ok-okozati összefüggést a sejtek osztódására, differenciációjára, apoptózisára és nekrozisára vonatkozólag. Vizsgáltam továbbá egy involválódó szerv, a méh, esetében *in situ* a szervezet energetikai állapotának hatását a sejtek apoptózisára.

Megállapítottam:

- (1) A butirát által indukált sejthalál és differenciáció összefüggésben van a különböző ROS mintázatokkal HT29-eredetű humán vastagbélrák sejtekben.
- (2) A HT29R sejtekben a butirát hatására képződő szabad gyökök és reaktív oxigén vegyületek a sejthalál termékei, míg a HT29-12 és HT29-21 sejtekben képződő H₂O₂ funkcionálisan a sejtdifferenciációhoz kötődik.
- (3) Meghatároztam a méh involúció korai időszakában az endometrium apoptotikus sejtjeinek arányát megfelelő energiaellátottságú, valamint negatív energia egyensúlyban lévő hyperketonaemiás tehenekben. Kimutattam, hogy az endometrium apoptózissal elhaló sejtjeinek száma a megfelelő energiaellátottságú egyedekhez képest a hyperketonaemiás tehenekben mintegy felére csökken.

Saját publikációk

Referált hazai vagy külföldön kiadott tudományos folyóiratokban megjelent (vagy közlésre elfogadott) publikációk

Domokos M., Jakus J., Szeker K., Csizinszky R., Csikó Gy., Neogrády Zs., Csordás Á., Gálfi P.: Butyrate-induced cell death and differentiation are associated with distinct patterns of ROS in HT29-derived human colon cancer cells. *Digestive diseases and sciences*, 2010., 55., 920-930.

Domokos M., Igyártó B., Glávits R., Mátis G., Pécsi A., Földi J., Kulcsár M., Huszenicza Gy. Neogrády Zs., Gálfi P.: Az endometrium apoptotikus sejt arányának csökkenése hyperketonaemiás tehenekben az involúció korai időszakában. *Magyar Állatorvosok Lapja*, 2010. Közlésre elfogadva.

Domokos M., Igyártó B., Pécsi A., Földi J., Kulcsár M., Neogrády Zs., Huszenicza Gy.: Detection of apoptosis in bovine endometrium during early period of involution. *Reproduction of domestic animals*, 2008., 3., 153.

Gálfi P., Jakus J., Domokos M., Neogrády Zs., Csordás Á.: A butiráttal szemben kialakuló konfluencia dependens rezisztenciát HT29 colorectalis adenocarcinoma sejteknél a redox státusz megváltozása okozza. *Folia hepatologica*, 2007., 11., 16.

Németh E., Halász A., Baráth A., Domokos M., Gálfi P.: Effect of hydrogen peroxide on interleukin-8 synthesis and death of Caco-2 cells. *Immunopharmacology and immunotoxicology*, 2007., 29., 297-310.

Kongresszusi kiadványokban megjelent előadás vagy poszter összefoglalók

Domokos M., Ígyártó B., Pécsi A., Földi J., Kulcsár M., Huszenicza Gy., Neogrády Zs., Gálfi P.: Detection of apoptosis in bovine endometrium during early period of involution. In: *16th International Congress of Animal Reproduction*, ICAR 2008. Budapest, Magyarország

Domokos M., Ígyártó B., Pécsi A., Földi J., Kulcsár M., Huszenicza Gy., Neogrády Zs., Gálfi P.: Az endometrium apoptotízisos sejtjeinek és leukocytáknak az előfordulása az involúció korai időszakában az energiaellátás függvényében. Akadémiai beszámolók 2008. Budapest.

Domokos M., , Neogrády Zs., Jakus J., Csordás Á., Gálfi P.: A Poli ADP-ribóz-polimeráz (PARP) szerepe az apoptózis/nekrózis arány alakulásában. Akadémiai beszámolók 2008. Budapest.

Domokos M., Ígyártó B., Pécsi A., Földi J., Kulcsár M., Huszenicza Gy., Neogrády Zs., Gálfi P.: Az endometrium apoptotízisos sejtjeinek aránya az involúció korai időszakában normo- és hyperketonaemiás tehenekben. In: *18. Magyar Buiatrikus Kongresszus összefoglalója*, Siófok, Magyarország, 2007.Október 10.

Domokos M., Jakus J., Neogrády Zs., Molnár T. ,Gálfi P.: A PARP szerepe a butirát kiváltotta sejthalál mechanizmusokban. Akadémiai beszámolók 2007. Budapest.

Domokos M., Rimanóczy Á., Neogrády Zs., Mihalik R., Csordás Á., Amberger, A., Gálfi P.: Colorectális adenocarcinoma sejtvonalak differenciálódása. Akadémiai beszámolók 2006., Budapest.

Szekér K., Csizinszky R., Domokos M., Neogrády Zs., Szabó B., Jakus J., Csordás Á., Gálfi P.: Drug specific changes of sensitivity to proliferation inhibition at confluence by the phytoestrogen resveratrol and other polyphenols in human colon cancer cells. In: *18th International Symposium of the Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, Seefeld, Ausztria, 2008. Szeptember 18-21.

Huszenicza Gy., Földi J., Pécsi A., Szabó J., Domokos M., Gálfi P., Kulcsár M.: Bacterial complications of uterine involution in cattle: clinical pathology, prevention, therapy. In: Früll, M. (Ed.) *Proceedings of the 13th International Conference on Production Diseases in Farm Animals*, 408-427., Lipcse, Németország, 2007. Június 29-Augusztus 4.

Huszenicza Gy., Földi J., Pécsi A., Domokos M., Szabó J., Kulcsár M., Gálfi P.: Complicaciones bacterianas de la involución uterina en vacas de leche. (Bacterial complications of uterine involution in dairy cows; translated from English) In: Cavestani D (Ed.) *Proceedings of the XXXVth Uruguayan Buiatrics Congress*, Paysandú, Uruguay, 2007. Június 7-11.

Gálfi P., Jakus J., Domokos M., Neogrády Zs., Csordás Á.: A butiráttal szemben kialakuló konfluencia dependens rezisztenciát HT29 colorectalis adenocarcinoma sejteknél a redox státusz megváltozása okozza. Abstract. In: *Magyar Szabad gyök Kutató Társaság IV. Kongresszusa*, Pécs, 2007. Október 11-13.

Csordás Á., Gálfi P., Jakus J., Molnár T., Domokos M., Neogrády Zs.: Synergistic effects of resveratrol on cell death induction by the histone deacetylase inhibitors butyrate and trichostatin A in HT29-derived colon

cancer cells. In: *Congress of Life Sciences*. Salzburg, Ausztria, 2006.
Szeptember 25-27.

Köszönetnyilvánítás

Elsősorban szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Prof. Dr. Gálfi Péternek, hogy lehetővé tette a témába való bekapcsolódásomat és az évekig tartó közös munka során sohasem hagyta lankadni figyelmemet. Köszönöm a segítséget és támogatást, amit munkám során nyújtott számomra.

Köszönet illeti Dr. Jakus Judit témabizottsági tagot, a Magyar Tudományos Akadémia Kémiai Kutatóközpont munkatárast, valamint Dr. Neogrády Zsuzsanna témabizottsági tagot a sokoldalú támogatásukért.

Köszönöm a Semmelweis Egyetem I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetből Dr. Mihalik Rudolf és Dr. Imre Gergely FACS analízisben nyújtott közreműködését, Dr. Csordás Ádám az Innsbrucki Orvostudományi Egyetem munkatársának segítségét, a sejttenyészeteken végzett feladatok kiértékelésében nyújtott támogatását.

Köszönöm a Mezőgazdasági Szakigazgatási Hivatal Állategészségügyi Diagnosztikai Főigazgatóságán Dr. Glávits Róbertnek és Mészáros Ágnesnek a szövettani munkákban nyújtott segítségét, valamint a Semmelweis Egyetem Humánmorfológiai és Fejlődésbiológiai Intézet munkatársának, Ígyártó Botondnak a nélkülözhetetlen támogatását.

Köszönetemet fejezem ki TDK hallgatónak, Dr. Mátis Gábornak a kísérletekben végzett segítségnyújtásáért.

Szeretném még megköszönni a Szent István Egyetem Állatorvostudományi Karán az Élettani és Biokémiai Tanszék valamennyi munkatársának, hogy támogatták munkámat, különös tekintettel Dr. Veresegyházy Tamás osztályvezető docens úrnak lelkesítő támogatását.

És a legfontosabbakat hátrahagyva végül férjemnek, családomnak és barátaimnak megköszönöm azt, hogy a legnehezebb pillanatokban is mellettem álltak.