

Szigetvár gyógyvíz és szervesanyag-izolátum hatása ditanollal exponált keratinocitákra

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

dr. Szabó István



Pécsi Tudományegyetem

Orvostudományi és Gyógyszerésztudományi Doktori és Habilitációs Tanács

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Vezető: Prof. Dr. Bogár Lajos

Daganatok molekuláris epidemiológiája doktori program

Programvezető: Prof. Dr. Kiss István

Témavezető: Prof. Dr. Varga Csaba

Pécs, 2024

1 Bevezetés

1.1 Balneológiai vonatkozások

A balneológia természetes vizek, peloidok, gázok (továbbiakban hatótényezők), gyógyító célú és szabadidős felhasználása. A balneológia a mindennapi fürdőüzemeltetési gyakorlaton kívül magában foglalja a balneológia eszközeinek tudományos vizsgálatát. Ez egyrészt jelenti a különböző hatótényezők kémiai összetételének elemzését, másrészt a terápia hatásosságának a vizsgálatát és a lehetséges hatásmechanizmusok feltárását. A balneológia gazdag történeti háttérrel rendelkezik, az emberiség ősidők óta kihasználta a természeti elemeket és a jótékony, valamint gyógyító hatások feljegyzésre kerültek. A gyógyító természetes elemek felhasználását a mindennapi orvosi gyakorlatban balneoterápiának hívjuk, mely napjainkban a modern orvoslás szerves része Magyarországon. A különböző betegségekre gyakorolt hatások feljegyzése a beteganyagon és tudományos értékelésük, valamint kontrollált humán vizsgálatok lefolytatása erős bizonyítékokkal alapozza meg az évezredek megfigyelésén alapuló tapasztalatokat.

A balneológia a gyakorlati alkalmazáson felül egyben egy multidiszciplináris tudományág, mely magába foglalja a geológia, a kémia, a fizika, az orvostudomány, a biológia és számos más tudományterület ismereteit. A balneoterápia számos betegség esetén kiegészítheti a klasszikus kezelési módszereket.

A vizeket általában szervesetlen összetételük alapján csoportosítják pusztán gyakorlati szempontból és megszokásból – a szervesetlen komponensek minőségi és mennyiségi analízise évszázados tudomány, napjainkban a gyakorlati műszeres elemzés megvalósítása rutinfeladat. Ezen felül a vizekben található jellemző szervesetlen anionok és kationok darabszámra pár tízes, mennyiségileg ezer milligrammos nagyságrendben vannak jelen. Elfelejtődik az a tény, hogy a természetes víz a földkérgen keresztül áthaladva nem csak szervesetlen anyagokkal találkozik, hanem szerves anyagok is bőségesen előfordulhatnak az útjában. Ezek a szerves anyagok beleoldódhatnak a vízbe és így jelentős szervesanyag-tartalmú vizek is a rendelkezésünkre állnak. Felmerül a kérdés, hogy milyen szerepük van a gyógyvízben található szerves vegyületeknek a gyógyvízzel kapcsolatba kerülő emberi szervezetre, valamint miképp felelősek a lehetséges gyógyító hatásért?

Varga munkájában kiemeli, hogy annak ellenére, hogy az elmúlt évtizedekben számtalan kutatócsoport foglalkozik a gyógyvizek szerves összetételével, a mai napig a gyógyító vizeket szervetlen összetételük alapján csoportosítják. A Varga-féle szerveshipotézis lényege, hogy a gyógyító hatás elemzésekor ne csak kizárólag az egyszerűbb szervetlen összetételt vegyék figyelembe (például kénes, hidrogén-karbonátos, vasas gyógyvíz) hanem a szerves komponenseket is beleértve a gyógyvíz összességének a hatását kutassák. Munkánk során Szigetvár Gyógyfürdő gyógyvizét és szervesanyag-kivonatát vizsgáltuk. Szigetvár területe a Délnyugat-Dunántúl porózus és hasadékos termál vízréteghez tartozik, ezen felül termálkarszt eredetű vizek is megtalálhatóak a környéken. A gyógyfürdő vize 62 °C-os, főleg nátrium-kloridos, alkáli-hidrogénkarbonátos összetételű.

1.2 A psoriasis megjelenése, kezelése és balneoterápiás szupportív kezelése

A psoriasis egyike azon betegségeknek, ahol a kiegészítő balneoterápia jelentős javulást eredményez a konvencionális terápia mellett. A psoriasis egy krónikus, immunmediált gyulladásos bőrbetegség. Klinikai megjelenése főleg a könyökökön, térden, fejbőrön, háton megjelenő piros, pikkelyes plakkok. A felsorolt leggyakoribb bőrfelszíneken kívül a test bármely táján megjelenhet. A betegség nagyban rontja a beteg életminőségét. A psoriasist ma már szisztémás betegségnek tekintjük. A lokális tüneteken kívül pszichés, metabolikus, mozgásszervi, valamint kardiovaszkuláris komorbiditások is megjelenhetnek. A betegség bármely életkorban megjelenhet, gyerekeknél is, de döntő többségében 35 éves életkor előtt jelenik meg. A psoriasis kóroki tényezői között egyrészt a genetikai háttér jelenik meg. Külső kóroki tényezők közül a bőr mechanikai irritációja, a légszennyezés, különféle gyógyszerek mellékhatásai, egyes oltások, fertőző betegségek, dohányzás és alkoholfogyasztás hozható összefüggésbe a betegség gyakoribb megjelenésével. Belső kóroki tényezők a metabolikus szindróma, elhízás, diabetes, diszlipidémia, hipertenzió, mentális stressz.

A psoriasis kezelésének alapja a lokális kezelés kortikoszteroid-tartalmú készítményekkel. Betametazon és kalcipotriol (D-vitamin analóg) hatóanyagok kombinációját tartalmazó készítményeket alkalmaznak. Az UV-fototerápia alkalmazása a biológiai szerek megjelenésével a háttérbe szorult. Második lépcsőként kismolekulájú szisztémás szerek alkalmazása közép súlyos/súlyos esetekben a kezelési protokoll részét képezi. Ide tartozó hatóanyagok az acitretin, a metotrexát és a ciklosporin. Ezek mellett kifejllesztésre kerültek orálisan alkalmazható, intracelluláris jelátviteli útvonalakat gátló

szerek is, mint például Janus-kináz (JAK) gátlók, vagy foszfodiészteráz-4 (PDE-4) inhibitorok. A legmodernebbnek számító biológiai terápia áttörést hozott a psoriasis kezelésében. Biológiai terápiás szereket 20 éve törzskönyveztek először hazánkban. A jelenleg használt szerek három lehetséges támadáspont egyikére hatnak: TNF- α , interleukin-23 (IL-23) vagy IL-17 citokineket blokkolják.

A psoriasis terápiájának egyik klasszikus vegyülete a ditranol (antralin, DTH), mely egy szintetikus antracén származék, hidroxiantron. Ez a szer napjainkra kiszorult a mindennapi klinikai gyakorlatból, azonban több helyen még alkalmazzák. A DTH vízben nem oldódik. Főleg kenőcsök, paszták, krémek formájában viszik fel a kezelendő felületre. A DTH fő hatásmechanizmusának a következőket tartják: szabadgyökös reakciókban való részvétel, oxigéntartalmú szabadgyökök generálása, a kialakult oxidatív stressz okozta apoptózis a plakk keratinocitáiban. Az erős oxidáló hatás okozza a fő mellékhatását, a plakk helyén és ép bőrfelületre kerülve irritációt és gyulladást okoz. Emellett a vegyület színe sárga, bőrfelületeket, valamint a vele érintkező tárgyakat (ruhák, fürdőszobai tárgyak) maradandóan elszínezi. A DTH klinikai alkalmazását és hatásmechanizmusának a feltárását végigkíséri az a paradigma, miszerint az alkalmazás során kialakuló irritáció és eritéma a hatás szükséges velejárója. Benezeder és mtsai. kutatásaikban erős bizonyítékokat találtak, melyek megdönthetik ezt a paradigmát. Eredményeik alapján a DTH-indukálta perilezionális és lézionális eritéma és az antipszoriátikus hatás között nincs összefüggés. Az irritáció és eritéma pusztán a DTH mellékhatása, nem terápiás mechanizmus.

1.3 A balneoterápia lehetséges (molekuláris) hatásmechanizmusai

A balneoterápia psoriasisra kifejtett hatását számos kutatás vizsgálja. A lehetséges hatásmechanizmusok felderítése a jövő kutatásainak a feladata, azonban számos molekuláris mechanizmus, főleg az apoptotikus és a gyulladásoz folyamatok terén már feltárára került. A gyógyvizek direkt antioxidáns hatása, antioxidáns rendszerekre való hatása, vagy oxidatív stresszel kapcsolatos biomarkerekre hatásának vizsgálata számos kutatócsoport fókuszában van.

Az antioxidáns hatást általában a kénvegyületekhez kötik, ami magától értetődő szulfidos gyógyvizek esetén, mivel a kénvegyületek közül számos, mint például a hidrogén-szulfid részt vesznek redoxireakciókban és erős antioxidáns hatással bírnak. A kérdés felmerül,

hogy alacsony kéntartalmú, vagy kénmentes gyógyvizek esetén nem számolhatunk antioxidáns hatással?

Az alapkőzet szerves anyagaival találkozó vizek oldható anyagokat mosnak ki, a sekély felszín alatti vizek magas koncentrációban tartalmaznak oldott szerves anyagokat. Ezeknek a koncentrációja akár a milligrammos nagyságrendet is elérheti, ha az összetételét vizsgáljuk, ezeknek a nagy része humin- és fulvosavakból áll. Ezekből az anyagokból termokatalitikus, vagy mikroorganizmusok általi kémiai bomlás által kisebb molekulájú szerves vegyületek, illetve gázok (CO₂, szénhidrogének) képződnek. Ezek a huminanyagok magasabb hőmérsékletű hévizekben lebomlanak, azonban a hidegebbek huminanyagokban dúsak.

Psoriasisos betegek számos gyulladásos paraméterei eltérnek a normál értékektől. Psoriasisban szenvedő betegek szérumban malondialdehid-szintjeit (MDA) vizsgálva szignifikánsan magasabb értékek találhatók egészséges egyénekhez képest. Szenczi és mtsai. egy pilot vizsgálatban 20 psoriasisos beteg szérumban mérték az MDA-szinteket a Harkányi fürdőkórházban. A betegek 3 hetes psoriasis kezelési protokollban vettek részt, melynek fontos eleme a DTH terápiát kiegészítő balneoterápia. Megállapították, hogy a Harkány gyógyvízzel balneoterápiában részesülő betegek plazma MDA-szintjei szignifikánsan alacsonyabbak a placebo kontrollhoz képest. Varga és mtsai. 5 ismert magyarországi gyógyvízből (Hévíz, Hajdúszoboszló, Gyopárosfürdő, Tiszaécske, Zalakaros) készítettek szervesanyag-izolátumot. Salmonella Ames tesztben megállapították, hogy az izolátumoknak nincs mutagén hatása, azonban az Ames tesztben vizsgálva UV sugárzás okozta letalitás ellen szignifikáns védelmet fejtettek ki.

Gerencsér et al. számos gyógyvízből készült szervesanyag izolátum UV sugárzás elleni védelmét vizsgálta HaCaT humán keratinocita sejtvonalon comet-assay módszerével. A HaCaT sejtek a comet-assay gélszerkezetben kapták meg a gyógyvíz-izolátum expozíciót és az UV besugárzást. Két gyógyvíz izolátum, Kakasszék és Gyopárosfürdő szignifikáns UV védelmet mutatott bizonyos kísérleti beállítások mellett.

2 A vizsgálat célja

A DTH hatásait psoriasisban számos kutatás vizsgálja sejtkultúra modelleken. Mivel a betegség hátterében a keratinociták rendellenes viselkedése az egyik fő kóroki tényező, immortalizált humán keratinocita sejtvonal (pld. HaCaT) széles körben alkalmazott

modell a DTH-expozíció hatásának vizsgálatára. A DTH fő hatásmechanizmusának a sejtek mitokondriumaiban oxidatív reakciókban való részvételt, reaktív oxigén szabadgyökök keletkezését, ezek hatására kialakuló oxidatív stresszt, majd ennek hatására apoptotikus folyamatok elindulását tartják.

A kísérletek során megállapították a DTH apoptózist kiváltó, még nem akut toxikus, de hatásos dózistartományát, az apoptózis korai és késői fázisának az időbeli lefolyását, oxidatív stressz megfigyelésére alkalmas markerek változását, a sejtek oxidatív stresszre adott molekuláris válaszait. A szakirodalomban szintén megtalálhatóak bizonyítékok a gyógyvíz, illetve a gyógyvíz komponenseinek hatásaira vonatkozóan. Találhatóak bizonyítékok a balneoterápia psoriasisban kifejtett hatására vonatkozóan. A szakirodalomban azonban – jelen tudásunk szerint - nem található bizonyíték DTH-expozíció és együttes gyógyvíz-expozíció hatásának vonatkozásában HaCaT sejtkultúrán vizsgálva. Szintén nem található bizonyíték Szigetvár gyógyvíz vonatkozásában DTH-expozíció kapcsán. Nem található bizonyíték Szigetvár gyógyvíz expozíció hogyan befolyásol egyes gyulladásos és oxidációs stresszel kapcsolatos markereket. Ezen felül nem található bizonyíték Szigetvár gyógyvíz szervesanyag-izolátumának (továbbiakban izolátum) hatására vonatkozóan.

Jelen vizsgálat sorozat célja:

Szigetvár gyógyvízből, valamint a belőle készült szervesanyag-izolátumból HaCaT sejtek számára tolerálható tápközeget készítettünk. Ezeknek a tápközegeknek elvégeztük az akut toxicitási vizsgálatait, megállapítva a 3 órás expozíció alatt a HaCaT sejtek életképesség-változását. Modellezve a klinikai gyakorlatban végzett egyszeri DTH-expozíciót, majd azt követő balneoterápiát a rövid távú kísérletes elrendezésünk 1 óra DTH-expozícióból, majd azt követő 3 órás Szigetvár gyógyvíz vagy szervesanyag-izolátum expozícióból állt. Célunk az volt, hogy ezt a kísérleti protokollt alkalmazva megvizsgáljuk, hogyan változik a sejtekben egyes oxidatív stressz hatására reagáló gyulladásos citokinek (TNF- α , IL-6, IL-8) és kemokin (GM-CSF) génexpressziója. Célul tűztük ki megvizsgálni, hogyan változik az oxidatív stressz markereként számotartott MDA-koncentráció, valamint hogyan változik az oxidatív stressz regulációjával kapcsolatba hozott miR-21-expressziója.

3 Vizsgálati anyag és módszer

A Szigetvár gyógyvízminták a Szigetvári Gyógyfürdőből származtak. A Szigetvár gyógyvíz izolátum Varga és mtsai. 1992 évi szabadalmán alapuló módszerrel készült, melyet Hanzel is felhasznált PhD munkájában. Az izolátum nem tartalmazza a gyógyvíz ásványi anyagait, azonban a szervesanyagok nagy részét tartalmazza az eredeti gyógyvízhez képest 3000x töménységben.

Kísérleteinkhez a Portalés és mtsai. által leírt módszert alkalmaztuk, melyben natív, vagy hígított gyógyvízhez portáptalajt adtak. Az így készített expozícióra alkalmas közegek gyógyvíz tartalma sokkal magasabb lehet, mint más hígítási módszerek esetén. Az izolátumot teljes tápközzel hígítottuk, hogy a következő hígításokat kapjuk: 6x, 12x, 30x, 40x, 60x, 120x, 250x, 300x, 400x, 600x, 1500x és 3000x. (A hígítás mértéke az izolátumra vonatkozik.). Vizsgálatainkat HaCaT immortalizált humán keratinocita sejtvonalon végeztük.

3.1 XTT sejtelétképesség-teszt

A teszt alapja az XTT tetrazólium só (2,3-bisz(2-metoxi-4-nitro-5-szulfonil)-2H-tetrazólium-5-karboxianilide) mely élő sejtek mitokondriumában metabolikusan redukálódik és egy vízzoldékony, színes formázán termék keletkezik. Ezzel direkt mérhető a sejt metabolikus aktivitása, ami korrelál az élő sejtek számával. A sejteket a 64 lyukú sejtenyésztő tálcába ültettük be. 3 óra inkubálás után a színintenzitást tálcaleolvasó segítségével 450 nm-en és 630 nm-en (háttér) mértük. A háttérintenzitás meghatározásához üres táptalajt és üres lyukat is lemértünk. Kontrollként exponálatlan sejteket mértünk. A méréseket közvetlenül a 3 órás expozíciós idő után végeztük. A sejttúlélési-vizsgálatok eredményeinek értékelésénél 100%-nak a kezeltlen (negatív kontroll) sejtek eredményeit vettem. Minden kísérleti beállítást háromszor ismételtünk meg.

3.2 Lipidperoxidáció malondialdehid (MDA) assay

A lipidperoxidáció oxidatív károsodás eredményeként következik be, és kvantitatív jelzője az oxidatív stressz mértékének. A többszörösen telítetlen lipidek különösen hajlamosak az oxidatív reakciókra, jellemzően reaktív oxigéngyökök által, amelyek jól meghatározott láncreakció során egy karakteres végterméket, például malon-dialdehidet (MDA) eredményez. Az általunk használt Sigma-Aldrich Lipid Peroxidation (MDA) Assay Kit (Sigma-Aldrich, Kat: MAK085) alkalmas az MDA szintjének meghatározására különböző mintákból, beleértve szöveteket, sejteket és vérplazmát. A reakció alapja az MDA és a tiobarbitursav (TBA) reakciója, amely fotometriával (532 nm) mérhető terméket képez, melynek koncentrációja arányos a minta MDA-szintjével.

3.3 Kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció (qRT-PCR)

A PCR vizsgálatokhoz az expozíciókat 96-lyukú sejtenyésző lemezekben végeztük. Előzetes vizsgálataink alapján a csésze 1 lyukában elegendő mennyiségű RNS található a későbbi mérésekhez. Minden kísérleti beállítást háromszor ismételtünk meg. A mintákat közvetlenül a csészéből nyertük ki az ExtraZol (Quiagen, Bliert) reagens és protokoll használatával. Az össz-RNS koncentrációt Maestrogen MN-913 spektrofotométer segítségével határoztuk meg. A primerek megtervezéséhez az NCBI Primer-BLAST szoftvert használtuk. A PCR reakciókat és méréseket egy LightCycler 480 PCR készülékben (Roche) végeztük el. A PCR alap reagens kit qPCRBIO SyGreen 1-step Detect Lo-ROX kit (PCRBiosystems, Kat: PB25.11-3) volt.

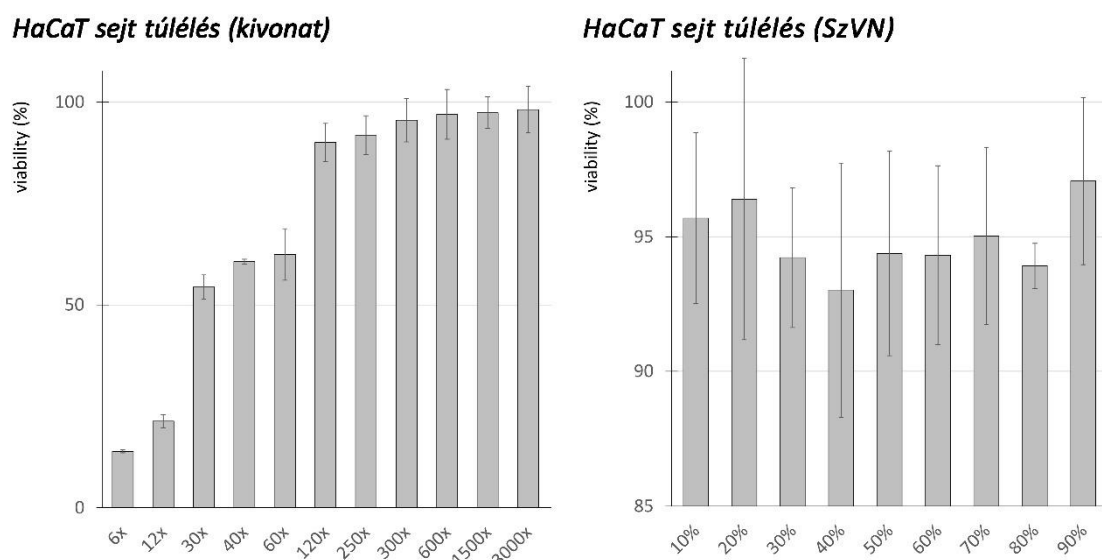
4 Eredmények

Az eredmények részben a Szigetvár gyógyvíz szervesanyag izolátumának 120x, 600x és 3000x hígítására 120x, 600x, 3000x izolátum hígításként vagy hígításként hivatkozom. A 90% natív Szigetvár gyógyvíz tartalmú tápközegre SzVN rövidítéssel hivatkozom.

4.1 Túlélési vizsgálatok

A kísérletsorozat bevezetéseként megvizsgáltam, hogy a Szigetvár gyógyvízből készült és Szigetvár szervesanyag-izolátummal szupplementált tápközegben hogyan éltek túl a HaCaT humán keratinocita sejtek. A kísérletsorozatot 3 órás expozíciós idővel végeztük

el. Az eredmények megjelenítésénél 100%-nak a kezeletlen (negatív kontroll) sejtek eredményeit vettem. Az eredmények a **1. ábrán** láthatóak.

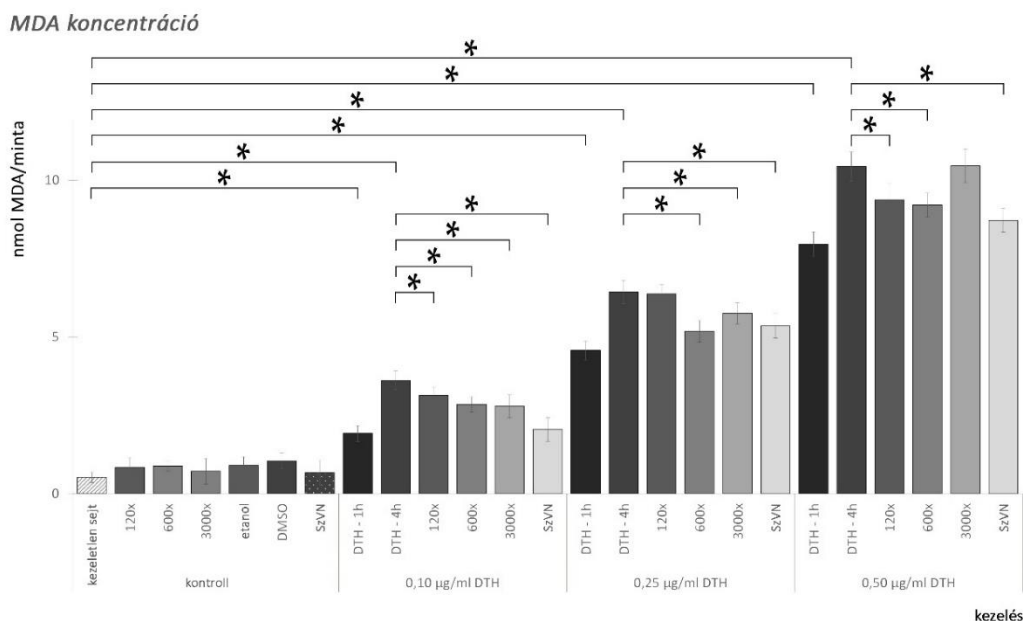


1. ábra (a) HaCaT sejtek túlélése Szigetvár gyógyvíz szervesanyag izolátum hígítási sorban (6x-3000x) (b) HaCaT sejtek túlélése különböző Szigetvár gyógyvíz tartalmú tápközegekben (10%-90%).

A túlélési görbék alapján látható, hogy az izolátum 120x hígítástól kezdődően a nagyobb hígítások irányában nem csökkentette szignifikánsan a sejtek túlélését. Az SzVN egyik összetétel esetén se mutatott szignifikáns különbséget a kontroll sejtek túléléséhez képest.

4.2 Lipid peroxidáció malondialdehid (MDA) assay

Az MDA koncentrációk mérési eredményei a **2. ábrán** láthatóak. Az oldószer kontrollok, az SzVN és az izolátum hígítások nem emelték szignifikánsan az MDA-szintet a kezeletlen sejtekhez képest. A DTH koncentráció-függően megemelte az MDA-szinteket a kezeletlen sejtekhez képest mind az 1 órás, mind a 4 órás expozíciók esetén. Az SzVN mindhárom vizsgált koncentráció esetén szignifikánsan alacsonyabb MDA-koncentrációt mutatott a 4 órás DTH expozícióhoz képest. Az izolátum-hígítások a legtöbb kísérleti beállításban szignifikánsan alacsonyabb MDA-koncentrációkat mutattak a 4 órás DTH expozícióhoz képest.

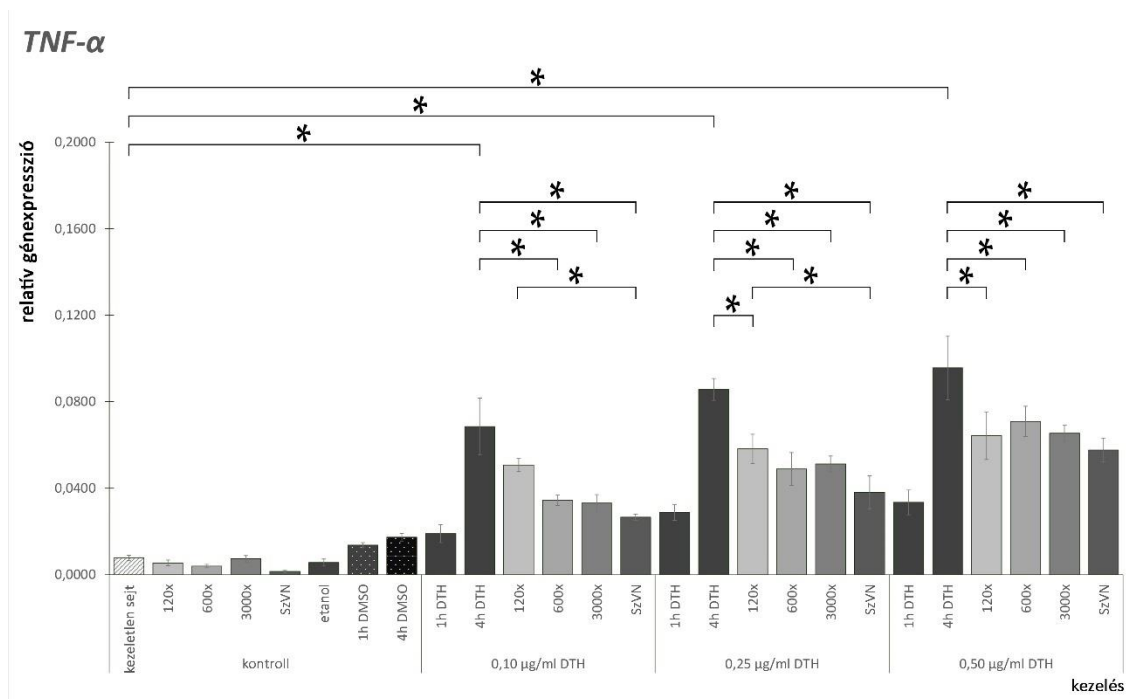


2. ábra MDA-koncentrációk (nmol/minta) a kísérleti elrendezés szerint exponált HaCaT sejtekben (* = $p < 0.05$).

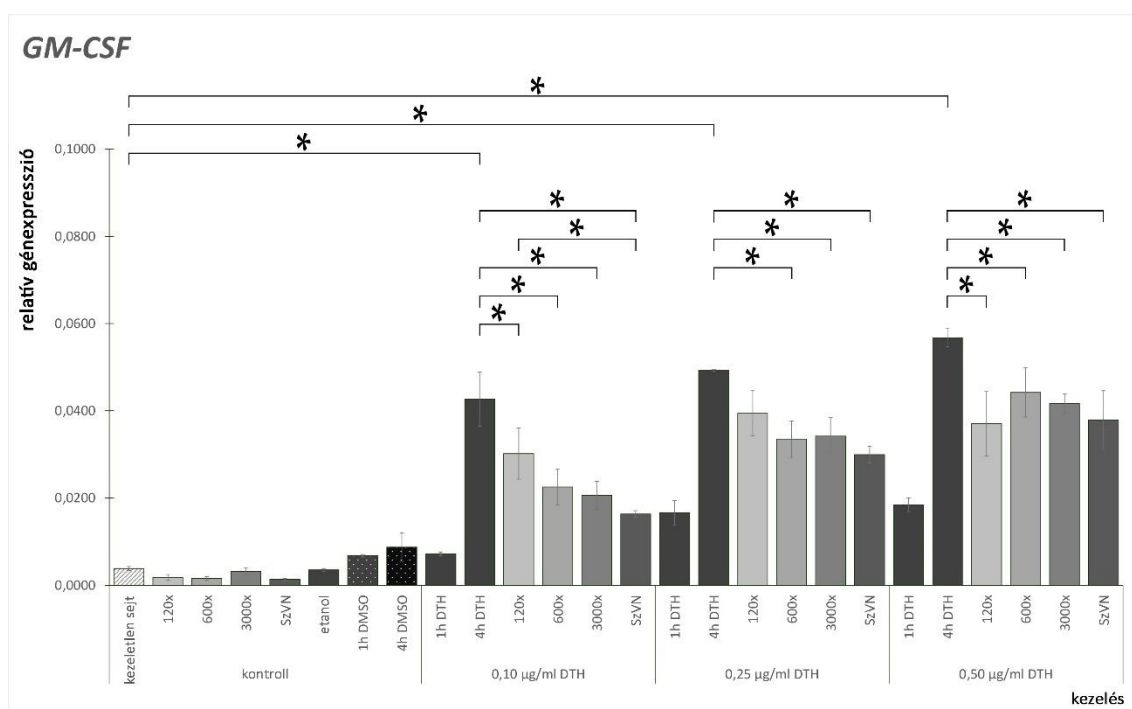
4.3 Gyulladásos citokinek mRNS-expressziójának vizsgálata RT-qPCR módszerrel

Az általunk vizsgált TNF- α , IL-6 és IL-8 citokinek és GM-CSF kemokin relatív-génexpresszió értékei a munkában alkalmazott kísérleti elrendezésben a **3-6 ábrákon** láthatóak.

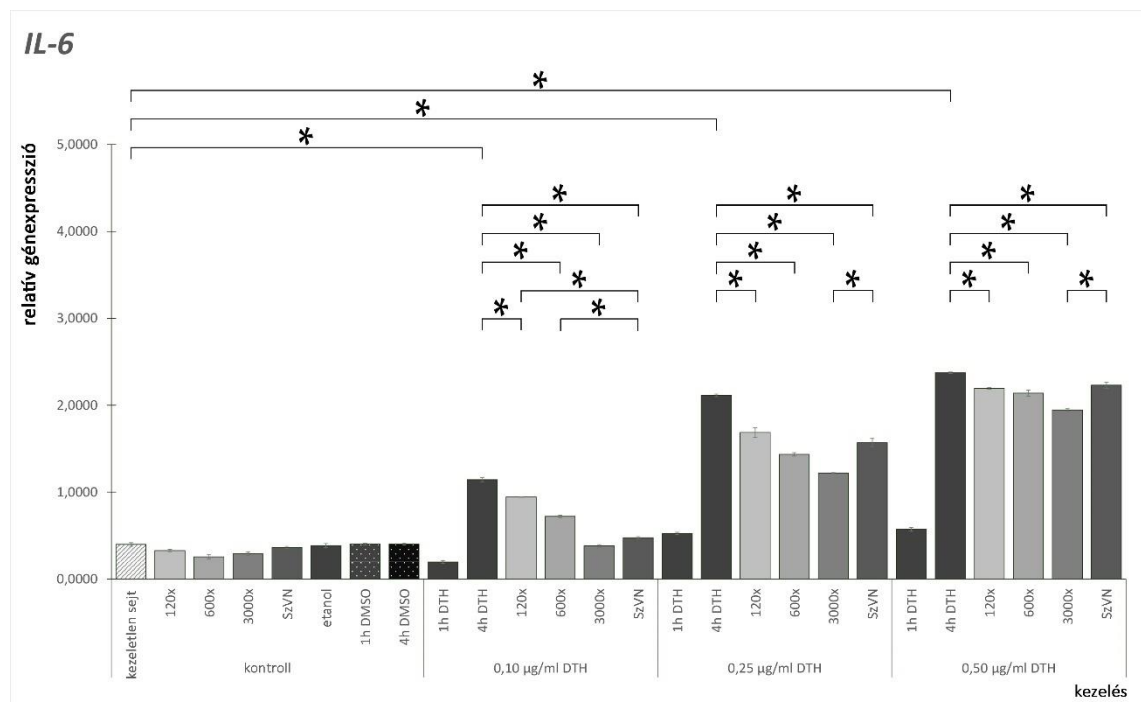
Összefoglalva elmondhatjuk, hogy egyik vizsgált citokin és kemokin esetén se tapasztaltunk szignifikáns emelkedést az oldószer kontrollok, valamint az SzVN és az izolátum hígítások esetén. A szakirodalmi adatokat összhangban 1 órás DTH-expozíciónál enyhén, 4 órás DTH-expozíció esetén markánsan megemelkedtek a vizsgált relatív génexpressziók. Az SzVN és az izolátumok hatását a DTH-expozícióra mindig a 4 órás DTH-expozíciós értékekhez viszonyítottuk. Általánosságban elmondható, hogy számos DTH-koncentráció esetén a DTH-expozíciót követő SzVN expozíció alacsonyabb mRNS-expressziós értékeket mutatott, mint a csak DTH-expozíciónak kitett csoportok értékei. Az izolátum expozíciónak kitett csoportok esetén számos esetben szignifikánsan alacsonyabb mRNS-expressziót kaptunk, mint a 4 órás DTH-expozíciós csoportok esetén. Általánosságban elmondható, hogy az SzVN expozíciónak kitett csoportok esetén általában alacsonyabbak voltak az expressziók, mint az izolátummal exponált csoportoknál. A három izolátum hígítás között nem tudtunk egyértelmű koncentrációfüggő tendenciákat meghatározni.



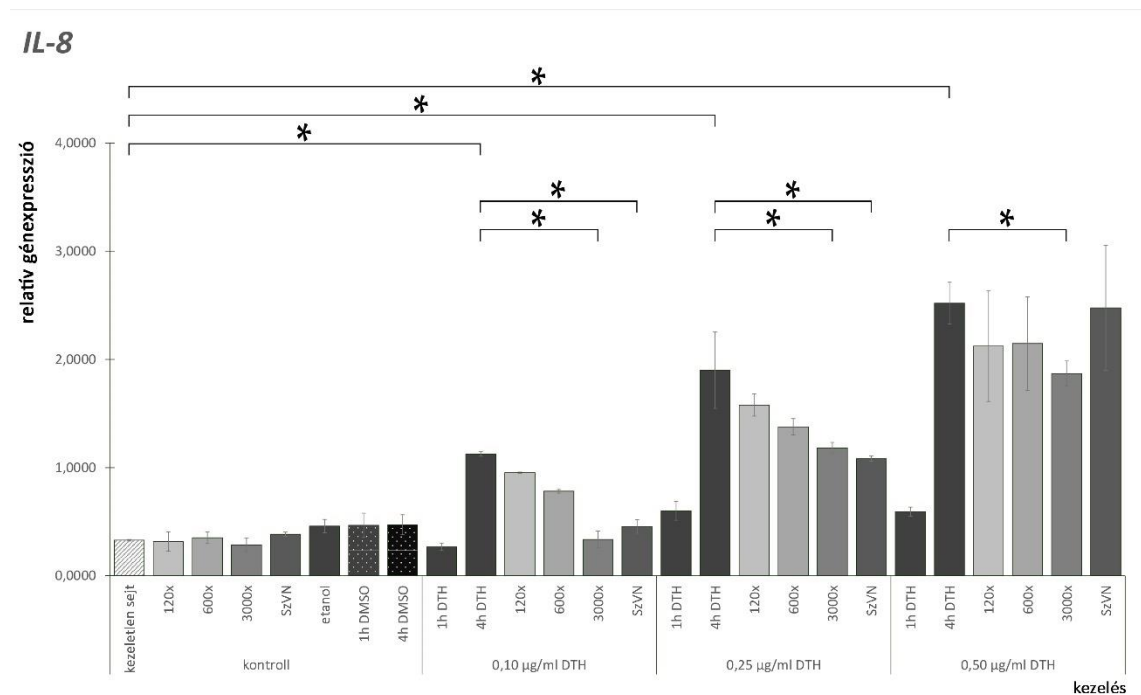
3. ábra TNF- α relatív génexpressziója a kísérleti elrendezés szerint exponált HaCaT sejtekben. (* = $p < 0.05$).



4. ábra GM-CSF relatív génexpressziója a kísérleti elrendezés szerint exponált HaCaT sejtekben. (* = $p < 0.05$).



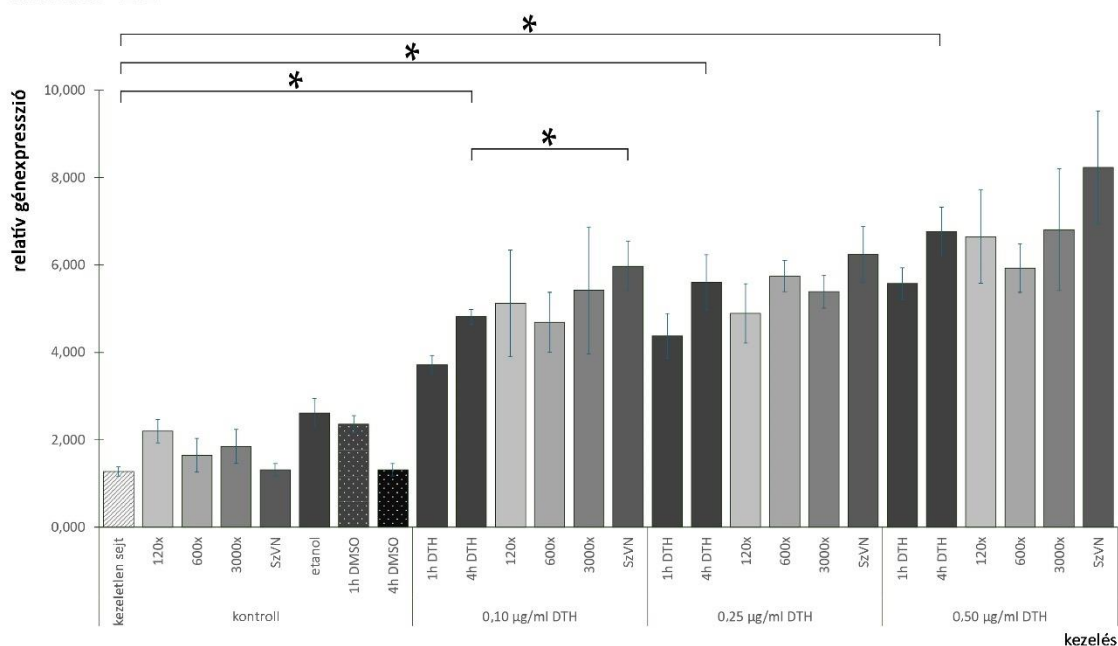
5. ábra IL-6 relatív génexpressziója a kísérleti elrendezés szerint exponált HaCaT sejtekben. (* = $p < 0.05$).



6. ábra IL-8 relatív génexpressziója a kísérleti elrendezés szerint exponált HaCaT sejtekben. (* = $p < 0.05$).

Ha elemezzük a miR-21 relatív expresszióját (7. ábra), sem az oldószer kontrollok, sem az SzVN, sem az izolátum esetén nem emelkedik a kezeletlen kontrol sejtekhez képest. Nem találtunk jelentős különbséget a vizsgált három koncentrációban a DMSO kontrollok között. Nem találtunk jelentős különbséget az etanol kontrollok között sem. Az 1 órás DTH-expozíció minden koncentráció esetén szignifikánsan megemelte a miR-21 szintjét (ez a 12. ábrán nincs jelölve). A 4 órás DTH-expozíciókat vizsgálva mindegyik szignifikánsan magasabb volt, mint a megfelelő 1 órás DTH expozíciók. Ha az SzVN és izolátum expozíciókat a 4 órás DTH-expozíciókkal hasonlítjuk össze, 0,5 µg/ml DTH mellett a 600x hígítás csökkentette a miR-21 expressziót, de a csökkenés nem szignifikáns. Minden DTH-koncentrációnál az SzVN expozíció a miR-21 relatív expresszió növekedését mutatta a 4 órás DTH-expozíciókhoz képest. Ez azonban csak 0,1 µg/ml DTH esetén szignifikáns.

miRNS-21



7. ábra miRNS-21 relatív koncentrációja a kísérleti elrendezés szerint exponált HaCaT sejtekben. (* = $p < 0.05$).

5 Megbeszélés

A psoriasis klinikai kezeléséhez kapcsolt balneoterápia pozitív eredményeket mutatott a gyógyulás tekintetében. Jelen vizsgálatokban fő célunk volt, hogy egy mellékhatásai miatt igencsak megkérdőjelezett, a klinikumból kiszorult, azonban hatásossága miatt a mai napig a psoriasis gyógyításában alkalmazott hatóanyagot, a DTH-t vizsgáljuk HaCaT keratinocita sejtkultúrán. A DTH a psoriasisos plakokban gyulladást indukál. Ezt a gyulladási reakciót sokan a mai napig a DTH szükséges terápiás mechanizmusának tartják. A DTH-nak kitett egészséges bőrfelületeken is irritációt, égő érzést, kipirosodást és elszíneződést okoz. Az egészséges bőrterületeken szintén gyulladási reakciókat indít el. A gyógyvizek és a balneoterápia lehetséges és bizonyított antioxidáns hatása számos tanulmányban megjelenik.

Eredményeink összhangban vannak a szakirodalomban leírt tendenciákkal. A DTH-expozíció jelentősen megemelte az MDA-koncentrációkat. Jelentős növekedés figyelhető meg mind az 1 órás, mind a 4 órás DTH-expozíció hatására. A növekedés dóziszfüggő. A gyógyvizek esetleges közvetlen antioxidáns hatását vagy a sejtek oxidatív stresszre adott válaszában történő módosítását különböző tanulmányok tárgyalták. Az antioxidáns aktivitást általában a redukáló szulfhidril-csoportok (tiol, SH) jelenlétének tulajdonítják a gyógyvizek természetes kén-tartalma miatt. Kísérletünkben egy olyan gyógyvizet választottunk, amely alacsony kén-tartalmú és szervesanyag-tartalmú. Az MDA-teszt eredményei alapján eredményeink korrelálnak az irodalmi adatokkal. A kezelt sejtek MDA-szintjét a DTH-expozíció megemelte. Jelentősebb növekedés volt megfigyelhető az első óra után, mint az azt követő három órában. Ez azt sugallja, hogy az oxidatív károsodási folyamatok korán bekövetkeznek a kezelés során. Fontos megemlíteni, hogy sem az SzVN, sem az izolátumok hígításai nem emelték szignifikánsan az MDA-szintet. Ez összhangban van a korábbi megállapításokkal, ahol a termálvizek védőhatást fejtettek ki az oxidatív károsodás ellen, nem idéztek elő oxidatív stresszt. Eredményeink szerint az SzVN szignifikáns védőhatást mutat a DTH által indukált MDA-emelkedéssel szemben a DTH-expozíció mindhárom koncentrációjában. Érdekes módon a szerves izolátumok is szignifikánsan alacsonyabb MDA-szinteket mutattak, ami arra utal, hogy a termálvíz szervesanyag-tartalma ugyanazt a hatást hordozza, mint a teljes víz, de a teljes védőhatás valószínűleg a szerves- és a szervetlenanyagok kombinációjának következménye. Az antioxidánsok dóziszfüggő módon hatnak a DTH-károsodás ellen. Esetünkben a szervesanyag-koncentrátum hatása nem egyértelmű. A 120x hígítás nem mutatott

szignifikáns védőhatást, a 600x hígítás nagyobb védőhatást mutatott, mint a 3000x hígítás.

Az elmúlt évtizedek kutatási bizonyították, hogy a normál keratinociták különböző típusú oxidatív stresszre reagálnak. Ezek a válaszok gyakran adhéziós molekulákat is indukálnak, melyek fokozzák a gyulladást, valamint az immunsejtek gyulladáshoz való vándorlását. A noxa több jelátviteli útvonalon keresztül – a mitogén-aktivált protein (MAP) kináz jelátviteli útvonalon vagy a protein kináz C aktiváción keresztül – vezet a gyulladáshoz vezető mediátorok, (beleértve citokineket, például a tumor nekrosis faktor-alfa (TNF- α), interleukin (IL)-6, IL-8 és GM-CSF) indukciójához, termeléséhez és felszabadulásához. A szakirodalom alapján a balneoterápia kedvező hatással van a gyulladáshoz vezető folyamatok által érintett sejtekre, de a víz összetételét is figyelembe kell venni.

Eredményeink összhangban vannak a szakirodalmi eredményekkel, amelyek szerint a balneoterápia csökkentette a gyulladáshoz összefüggő molekuláris markerek szintjét. Mindezek alátámasztják a gyógyvizek és a balneoterápia gyakorlatban megfigyelt hatásait. Kísérleteinkben bebizonyítottuk, hogy a Szigetvár gyógyvíz hasonló tulajdonságokkal rendelkezik. Első alkalommal bizonyítottuk, hogy ha a szerves anyagokat elválasztjuk a szervetlenektől és külön-külön vizsgáljuk, akkor a szervesanyag-tartalom önmagában is pozitív hatást gyakorol az általunk vizsgált gyulladáshoz vezető citokinek túlzott expressziójára. Az Szigetvár gyógyvíz tartalmú tápközegek következtében jobb eredményeket mutatott a szerves izolátumokhoz képest, ami arra utal, hogy a szerves és szervetlen tartalom együttesen felelős a hatásért. A 3000-szeres hígítás - amely ugyanakkora szervesanyag-koncentrációval rendelkezik, mint az eredeti gyógyvíz – hasonló tendenciájú, de mérsékeltebb eredményeket mutatott az emelkedett citokinszintek csökkentésében az SzVN-hez képest. A 600x hígítás a legtöbb esetben jelentősen csökkentette a citokinszinteket. Másrészt a 120x hígítás sok esetben nem nyújtott védelmet a DTH által kiváltott citokinszint-emelkedéssel szemben. Eredményeink alapján a Szigetvár Gyógyvíz és izolátum önmagában nem emelte meg a vizsgált markerek génexpresszióját, ez arra enged következtetni, hogy az expozíció önmagában nem okoz oxidatív stresszt.

5.1 mikroRNS-21 expresszió vizsgálata

A mikroRNS-ek (miRNS, miR) rövid, nem kódoló RNS szakaszok, amelyek számos fiziológiai és patológiai folyamatot befolyásolnak. A génexpresszió poszttranszkripció szabályozói, mivel szekvenciaspecifikus módon kötődnek az érett mRNS-ekhez és kölcsönhatásba lépnek velük. A miR-21 a ROS homeosztázis és a nem fiziológiás oxidatív stresszre adott válaszok egyik kritikus szabályozója. miR-21 expresszió eredményeink összhangban vannak a szakirodalomban megtalálható eredményekkel. A miR-21-expressziója a DTH-expozíció hatására megnövekedett a kezeletlen sejtekhez képest. Az SzVN és az izolátumok önmagukban nem növelik a miR-21-expressziót a kezeletlen sejtekhez képest. Az SzVN látszólag megemelte a miR-21 szintjét a 4 órás DTH-expozíciókhoz képest, de ez csak 0,1 µg/ml DTH-expozíció esetén volt szignifikáns. Az SzVN- és az izolátum-expozíciók csökkentették a TNF- α mRNS-expresszióját, de ez nem tükröződött közvetlenül a miR-21-expresszió változásában. Eredményeink alapján a miR-21-expressziójának a növekedését lényegében nem befolyásolja sem a Szigetvár gyógyvíz, sem az izolátum- expozíció. A DTH indukálta miR-21-expresszió emelkedést viszont nem befolyásolta szignifikánsan az SZVN és az izolátum-expozíció, kivéve 0,1 µg/ml DTH és SzVN együttes expozíciója esetén tapasztaltunk szignifikáns miR-21-expresszió emelkedést. Eredményeink a 7. hipotézisünket nem támasztják alá megfelelő módon.

6 Új tudományos eredmények

Portáptalaj hozzáadásán alapuló módszert alkalmazva olyan tenyésztő közeget hoztunk létre, ami 90%-ban tartalmaz Szigetvár gyógyvizet és nem toxikus a HaCaT sejtekre. A Szigetvár gyógyvíz szervesanyag-izolátumával szupplementált tenyésztő közeg 120x, 600x és 3000x hígításban nem toxikus HaCaT sejtekre.

A 90% Szigetvár gyógyvíz-tartalmú sejtenyésztő közeg 3 órás expozíciós idő alatt nem emelte szignifikánsan a malondialdehid koncentrációját HaCaT sejtekben. Ez azt mutatja, hogy a gyógyvíz önmagában nem okoz oxidatív stresszt. Egyik vizsgált szervesanyag-izolátum hígítás (120x, 600x és 3000x) sem emelte szignifikánsan az MDA-koncentrációt 3 órás expozíciós idő alatt a kezeletlen sejtekhez képest. Ez bizonyítja, hogy az izolátum önmagában nem okoz oxidatív stresszt HaCaT sejtekben vizsgálva.

1 órás ditranol-expozíciót követően 3 órás Szigetvár gyógyvíz, illetve Szigetvár gyógyvíz szervesanyag-izolátum expozíciót végeztünk. Azon csoportok esetén, ahol a ditranol-expozíciót Szigetvár Gyógyvíz, vagy szervesanyag-izolátum expozíció követett, számos kísérleti beállítás esetén szignifikánsan alacsonyabb malondialdehid-koncentrációt mértünk a kontroll csoportokhoz képest. Ez oxidatív stressz elleni védőhatásra enged következtetni.

Sem a 90% Szigetvár gyógyvíz-tartalmú tápközeg, sem belőle készült szervesanyag-izolátum hígítások nem emelték szignifikánsan az általunk vizsgált gyulladásos citokinek (TNF- α , IL-6, IL-8) és kemokin (GM-CSF) relatív mRNS-expresszióját semelyik vizsgálati beállításban. Ez alátámasztja azt a feltételezésünket, hogy az expozíciós közegek önmagukban nem okoznak oxidatív stresszt.

Három koncentrációban alkalmazott (0,1, 0,25 és 0,5 μ g/ml) ditranol-expozíció hatására az általunk vizsgált oxidatív stresszre jellemző citokinek (TNF- α , IL-6, IL-8) és kemokin (GM-CSF) mRNS-expressziója megemelkedik. Egy órás ditranol-expozíciót követő 3 órás Szigetvár Gyógyvíz és szervesanyag-izolátum hígítás expozíció hatására több kísérleti beállítás esetén a vizsgált citokinek és kemokin mRNS-expressziója szignifikánsan alacsonyabb értéket mutatott a csak ditranol-expozíciónak kitett sejtekhez képest. Ez oxidatív stressz elleni védőhatásra enged következtetni.

7 További célok

Jelen kísérletsorozatban a DTH-expozíció rövidtávú hatását vizsgáltam a Szigetvár gyógyvíz és izolátum tekintetében. Távolati terveinkben szerepel a DTH-expozíció vizsgálata 24 órás időtartamban. 6 órás expozíciós időtartam után a sejtekben az apoptotikus folyamatok megindulnak, mely már a morfológiai megfigyelések alapján is látható. Ebben a kontextusban a sejttúlélési-vizsgálatok is új eredményt adhatnak, a DTH-expozícióhoz képest javuló túlélés a gyógyvíz védő hatását mutathatja. A szakirodalomban számos apoptózissal összefüggő regulátor (BCL-2, BCL-XL) kifejeződését vizsgálták DTH-expozíció kapcsán. Ezeknek a markereknek a változását érdemes megvizsgálni gyógyvíz expozíció hatására is, mivel az apoptotikus folyamatok gátlása védő hatást jelezhet. Ezen felül az apoptózis folyamata követhető a DNS-töredezettség vizsgálatával, melyre az üstökös-elektroforézis módszere alkalmas.

Esetleges szignifikánsan kisebb DNS-töredezettséget mutató eredmények szintén védő hatást mutathatnak a DTH károsítása ellen. Szintén érdemesnek tartom megvizsgálni a DTH-expozíciót és a gyógyvíz-expozíciót egy időpontban elkezdve, illetve gyógyvíz-előkezelést alkalmazva. A gyógyvízben található szervesanyagok a sejtekben felhalmozódhatnak és direkt védőhatást fejthetnek ki a későbbi DTH-expozíció ellen. A feltételezett antioxidáns hatást bizonyítandó érdemes a fenti beállításokkal elvégezni az MDA tesztet, illetve más direkt antioxidáns hatást kimutató teszteket. Ezeken felül a szervesanyag-teóriát még jobban alátámasztandó és a szervetlen-szerves komponensek hatásainak elkülönítését vizsgálándó érdemesnek tartjuk egy szervesanyagaitól megfosztott, azonban a sókat változatlan formában tartalmazó preparátum elkészítését és tesztelését az eredeti gyógyvíz, valamint a szervesanyag-izolátum mellett.

8 Publikációs jegyzék

Az értekezéssel összefüggő publikációk

Folyóirat közlemények:

Az értekezés alapjául szolgáló publikációk:

Szabó, I., Varga, Cs. (2020). Finding possible pharmacological effects of identified organic compounds in medicinal waters (BTEX and phenolic compounds). *International Journal of Biometeorology*, 64(6), 989-995. – Az értekezés alapjául szolgáló publikáció.

Q-besorolás: Q2

IF: 2,68 (2019)

Szabó, I., Szenczi, Á., Zand, A., Varjas, T., Varga, Cs. (2024) The effect of Szigetvár medicinal water on HaCaT cells exposed to dithranol. *Life*. (Közlésre elfogadva.) – Az értekezés alapjául szolgáló publikáció.

Q-besorolás: Q1

IF: 3,2 (2024)

Az értekezéssel összefüggő publikációk:

Gerencsér, G., **Szabó, I.**, Szendi, K., Hanzel, A., Raposa, B., Gyöngyi, Z., & Varga, C. (2019). Effects of medicinal waters on the UV-sensitivity of human keratinocytes - a comparative pilot study. *International Journal of Biometeorology*, 63(10), 1417-1423.

Varga, Cs., Szendi, K., **Szabó, I.**, Gerencsér, G., & Németh, B. (2024). "Gyógyhatású víz" – Egy (két) elhibázott rendeletről. *Orvosi Hetilap*, 165(33), 1303-1304.

Előadások:

Szabó, I., Varga Cs. (2013). Hazai gyógyvizeink szervesanyagainak hatástani áttekintése tömegspektrometriával nyert adatok alapján. Magyar Balneológia Egyesület 2013. Évi Nagygyűlése Mezőkövesd (2013. november 15-17.).

Szabó, I., Varga, Cs. (2019) Gyógyvizek szervesanyag-tartalmának lehetséges farmakológiai hatásai: BTEX és fenolos vegyületek. Magyar Balneológia Egyesület 2019. Évi Nagygyűlése Egerszalók (2019. november 15-17.).

Szabó, I., Varga, Cs. (2021) Gyógyvizek szervesanyag-tartalmának lehetséges farmakológiai hatásai 2. Magyar Balneológia Egyesület 2021. Évi Nagygyűlése Harkány (2021. november 12-14.)