

37. OTDK Biológia szekció

In vitro neuroendokrin modell a cukorpótló vegyületek hatásainak vizsgálatára

Kiss Péter Sándor

(Biomérnök BSc szak, jelenleg Biotechnológia MSc szakos hallgató, I.
évfolyam)

Küldő intézmény: Szegedi Tudományegyetem, Juhász Gyula Pedagógusképző Kar

Témavezetők:

Dr. Molnár Zsolt

Beosztás: főiskolai docens

Dr. habil. Radács Marianna

Beosztás: habilitált főiskolai tanár

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALMI ÖSSZEFOGLALÓ	3
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	5
I. BEVEZETÉS	6
II. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	9
II.1. A K-ACESZULFÁMRÓL	9
II.2. A XILITRÓL	10
II.3. AZ ERITRITRÓL	10
II.4. A SZTÍVIÁRÓL	11
II.5. A JELÁTVITELI MECHANIZMUSRÓL	11
II.6. AZ EXOCITÓZIS MECHANIZMUSA, ENERGIAIGÉNYE	13
II.7. CUKOR HOMEOSZTÁZIS SEJTBIOLOGIAI FOLYAMATAI	16
II.8. AZ OXITOCIN HORMON SZEREPE ÉS JELENTŐSÉGE	20
III. MÓDSZEREK	21
III.1. <i>IN VIVO</i> KÍSÉRLETI ELRENDEZÉS	21
III.2. <i>IN VITRO</i> KÍSÉRLETI PROTOKOLL	21
III.3. HORMONMEGHATÁROZÁS	22
III.4. STATISZTIKAI ELEMZÉS	22
III.5. EGYÉB MÓDSZEREK	22
IV. EREDMÉNYEK	23
IV.1. A MODELL ALKALMASSÁGÁNAK IGAZOLÁSA	23
IV.2. A CUKORPÓTLÓ VEGYÜLETEK EXPOZÍTOR HATÁSAI <i>IN VITRO</i> SEJTKULTÚRA MODELLBEN	24
V. MEGBESZÉLÉS, KÖVETKEZTETÉS	28
VI. IRODALOMJEGYZÉK	29
VII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	33

Tartalmi összefoglaló

A normál humán homeosztázisban a táplálkozási alapanyagok szénhidrát, lipid, protein és ásványi, valamint vitamintartalma determináló az egészség megőrzésében. Amikor valamilyen szisztémás humán szervezeti zavar, pl. cukor-anyagcsere-zavar lép fel, akkor ezeknek, az egyébként egyszerű anyagbevitelnek megváltozik a minőségi és mennyiségi aránya is, homeosztatikus válaszokat generálva. Az oxitocin (OT) 9 aminosavból álló peptidhormon., melynek simaizom kontrakciós szerepe alaposan feltárt, azonban emellett az emberi szociális viselkedés effektor neuropeptidjeként is ismeretes. A kötődés, a bizalom, a kognitív, valamint az empátogén tulajdonságok mediálásáért is felelős kreatív elem. Szakirodalmi adatok azt igazolják, hogy az OT elősegítheti a pozitív proszociális viselkedést is, azáltal, hogy szerepet játszik a bizalom és az altruizmus jelenségében is. Emberben intranazálisan adagolva a szorongás, szociális feszengés tüneteinek csökkenését figyelték meg. Ebben a viszonyban a noradrenalin rendszer aktiválódása kritikus szereppel bír az OT felszabadulása szempontjából. Célunk a rendszerszintű kapcsolatfeltárás az OT release és cukorpótló anyagok között, ezért a cukorpótló vegyületek hatásait *in vitro*, az OT hormon elválasztásával megvalósító neurohipofízis sejtek kultúrájával vizsgáltuk.

Vizsgálati protokollban ♂ Wistar törzsű patkányokat *in vivo* kezeltünk K-aceszulfám (40,0 mg/tt. kg/nap), eritrit (0,05 g/500 cm³), xilit (40 mg/ tt.kg/nap) és sztívia (40 mg/tt.kg/nap) cukorpótló ágensekkel 16 héten keresztül (n=5/csoport). A kezelés végpontjában a dekapitált patkányok neurohipofízisét szeparáltuk, majd *in vitro* primer sejt kultúrákat készítettünk. A neurohipofízis szöveteket enzimatis (tripszin: 0,2 % /Sigma, Germany/, 30 min; kollagenáz /Sigma, Germany/: 30 µg/cm³, 40 min; diszpáz /Sigma, Germany/: 50 µg/cm³ 40 min; T: 37°C) és mechanikus disszociáltatás útján kezeltük. A sejtek Tripán-kék tesztelési viabilitás vizsgálata után (>95%), a sejt kultúrákat OT vonatkozásában funkcionálisan standardizáltuk. A kísérleti *in vitro* rendszerekhez 10⁻⁶ M-os dózisban, külön rendszerben noradrenalint is adtunk. A minták felülúszó médiumából az OT tartalmat ELISA módszerrel határoztuk meg. A protein tartalmat Lowry módosított módszerével határoztuk meg. A statisztikai adatokat egyszempontos varianciánálízissel vizsgáltuk (ANOVA, n=5, p<0,05).

Az *in vivo* kezelések csökkentették az OT szintet, azonban az előkezelt, további cukorpótlás során az OT szint, *in vitro* jelentősen emelkedett. Noradrenalin szabályozási körben az OT release erősen modulált. A szabályozási rendszerek, a neuro-endokrino-immuno funkciókkal nagy anyagcsereláncolat kaskádját szabályoznak. Vizsgálatainkat *in vivo* és *in vitro* állatkísérletes modellek segítségével, sejt szintű kutatási elrendezésben tanulmányozzuk, továbbá a cukorpótló ágensek hatásait figyeltük noradrenalin mediált OT hormon release

funkciókra. Eredményeink figyelemfelkeltőek, olyan hormon függvényében, mely jelentős szerepű az empatogén pszichés funkciókban.

Kulcsszavak: cukorpótló vegyületek, ELISA, homeosztázis, neurohipofízis, noradrenalin, oxitocin

Rövidítések jegyzéke

ADP-adenozin-difoszfát

ATP- adenzin-5'-trifoszfát

AKT- protein-kináz-B

ATP- adenzin-trifoszfát

cAMP- ciklikus-adenozin-monofoszfát

ELISA- enzimjelzéses immunanalitika

GLUT1- glükóztanszporter-1

GLUT2- glükóztanszporter-2

IR- inzulin receptor

IRS- inzulin receptor szubsztrát

JAK-Janus-kináz

JECFA- Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives

KoA- koenzim-A

NA-noradrenalin

NSF- N-etil-maleimid-szenzitív faktor

nSec1- vezikula transzport kapcsolt protein

OT-oxitocin

PBS- foszfát-puffer

PI3K- foszfatidil-inozitol-3-kináz

PIP- foszfatidil-inozitol-4-5biszfoszfát

PDK1- foszfatidil-inozitol-dependens protein kináz 1

SEM- az átlag standard hibája (standard error of means)

SOCS3- citokin szignalizációs 3-szupresszor protein

SNAP25- szinaptoszóma asszociált protein

SNARE- szolubilis N-etil-maleimid-szenzitív faktor-kötő fehérje receptor

STAT- szignál transzdúcer és transzkripció aktivátor protein

Rab- RAS-asszociált kötő protein

VAP33-synaptobrevin-kötő protein

WHO- Egészségügyi Világszervezet

I. Bevezetés

Az egészség kiteljesedésére az alábbi négy feltétel teljesülése adja a legnagyobb esélyt: 1. ha az egyén a társadalomba integrálódik (családhoz, iskolai, munkahelyi és más közösségekhez tartozik), 2. ha a változó terheléshez alkalmazkodni tud, 3. ha individuális önállóságát megőrzi, és végül, 4. ha megteremti az összhangot a biogenetikai, a fizikai, a lelki és a társadalmi lehetőségei közt [1]. A társadalmi szerepvállalásban a szociális, tanulási, emocionális, intellektuális aktivitások révén valósul meg az alkalmazkodás. Ebben különös jelentősége van a táplálékul szolgáló anyagok minőségének is. A mentális egészség megőrzésében a neuro-endokrin rendszer kardinális jelentőséggel bír [2]. A szabályozási rendszerek, a neuro-endokrino-immuno funkciókkal e nagy anyagcsereláncolat mechanizmusok kézbe tartását végzik [3]. Amennyiben nem a megfelelő alapanyag kerül egy egészséges szervezetben a metabolizáló útvonalra, akkor ennek zavarát a regulációs ciklusok próbálják kompenzálni. Mindezek értelmezéséhez biológiai alaputatásként olyan mechanizmusokat tárunk fel, amelyek segítségével biológiai rendszermodelleket alakítunk ki. A vizsgálat rendszerszintű komplexitásként értelmezhető, azáltal, hogy a toxikológiai paraméterelemzéseket a neuroendokrin rendszer alapkutatásával végezzük (elsősorban a neurohipofízis oxitocin /OT/ hormonja által).

Normál humán homeosztázisban a táplálkozási alapanyagok szénhidrát, lipid, protein és ásványi, valamint vitamin anyagtartalma determináló az egészség megőrzésében. Amikor valamilyen szisztémás humán szervezeti zavar, pl. cukor-anyagcsere-zavar lép fel, akkor ezeknek, az egyébként egyszerű anyagbevitelnek megváltozik a minőségi és mennyiségi aránya is [3].

Ebben a vonatkozásban rendkívül érdekes kérdés, hogy a társadalmi lét pszichikai aktivitási elemei (pl. kogníció) mennyire változhatnak a neuroendokrin kommunikáció mediálásával (pl. noradrenalin (NA) közvetítés), amikor azt táplálkozásbiológiai ágensek, mint cukorpótló vegyületek a valós technoszféra expozíciókon keresztül szükségszerűen megváltoztatják. A tanulás és az emlékezés folyamataiban ugyanis a neuro-endokrin rendszer által szabályozott biológiai mechanizmusok dominánsan megjelennek, hálózati kapcsolatot mutatva az esszenciális lokális rendszertulajdonságokkal. Az OT a kognitív, emocionális, viselkedésbeli szerepe igazolt, ugyanakkor a rendszer szabályozási mechanizmusában a NA, adrenalin, hisztamin, szerotonin is [4].

A táplálékkiegészítő vegyületeket, mint expozítorokat, *in vitro* modelleken keresztül vizsgáljuk, hogy ezen belül milyen hatást váltanak ki a neuro-endokrinológiai kommunikáció

eseményeire (hormon elválasztások, NA és receptor funkció-hormon release kapcsoltság) és ezek az expozíciós hatásra miképpen változnak.

Az emberi homeosztázis fenntartásában egy olyan biokémiai kaszkád rendszer is esszenciális szerepet kap, mint a cukoranyagcsere, és ezzel együtt a monomer szénhidrát vegyületek hasznosítása. A társadalom technológiai folyamatai során a finomított cukor tiszta szénhidrátnak tekinthető, általánosságban cukorrépából és cukornádból nyerik, kémiai szerkezetét tekintve szacharóz [5], azaz a fruktóz és a glükóz egységek glikozidos kötéssel kapcsolódnak össze a molekulában. E diszacharid molekulát kémiai reakciók sorozatával lebontja a szervezet, és ebből képes fedezni a különböző bioszintézis utak energia igényét, aktív transzport folyamatokat. Továbbá fontos megemlíteni, hogy a túlzott cukorfogyasztás komoly elhízáshoz vezethet, ami napjaink társadalmának egyik kardinális egészségügyi problémája [6]. Manapság a társadalmi nyomás hatására (túlzott munkaterhelés, megfelelési kényszer, rendszertelen étkezés, testképzavar, depresszió, trendek) az emberek cukorfogyasztása is megváltozott, sok esetben a természetes cukorvegyületeket olyan mesterségesen előállított cukor termékek váltották fel, amelyek fogyasztásának hatásairól (itt beleértjük a negatív, pozitív tulajdonságokat) még nem minden téren tudtunk biztos, releváns konklúziókat megállapítani. Mivel jelen munkám központi kérdése, hogy a különböző mesterségesen előállított cukorpótló vegyületek milyen hatást gyakorolnak a neuro-endokrin rendszeren belüli hormon szintézisekre (ezen belül is az OT hormonra), így a következő fejezetekbe szeretném ismertetni e mesterséges termékek sajátosságait.

A cukormentes, mesterséges édesítőszeres megfelelő besorolásáról, maximális fogyasztható mennyiségéről a **Magyar Élelmiszerkönyv 1-2-94/35** számú előírása rendelkezik [7]. Vannak olyan cukorpótló vegyületek, melyeket a természetben is megtalálunk, viszont olyanokat is fogyasztunk, amelyeket szerves vegyületekből szintetizálunk mesterséges körülmények között. Jelen szakdolgozatomban mind a kettő csoportból fogok kiemelni termékeket. A természetes édesítőszeresek közé tartozik többek között a **xilit**, **eritrit**, **sztívia**, amelyeknek fontosabb kémiai jellemzőit ismertetni fogom. A mesterséges cukorpótló vegyületek közül a **K-aceszulfámot** (E 950) fogyasztották *in vivo* a patkányok, és e termék tulajdonságait fogom összefoglalni.

A munkához kapcsolódó céljainkat a következő pontokban kívánom tematikusan prezentálni:

1. Dolgozatomban fontos célkitűzési pont, hogy hiteles és referált szakirodalmak segítségével megismerjem a cukorpótló vegyületek előállításának, felhasználásának lehetőségeit. Ebben a relációban kiemelt feladatom annak megvalósítása is, hogy az elméleti áttekintést a neuroendokrin rendszer vonatkozásában, különös tekintettel az OT elválasztásra megismerjem.
2. Jelen munkában célunk olyan standardizált *in vivo* és *in vitro* modellrendszert kialakítani, amellyel jól tanulmányozhatók, jól nyomon követhetők a különböző expozíciós hatások, így jelen dolgozatban a cukorpótló vegyületeket kívánjuk expozítor vegyületként alkalmazni.
3. A kísérleti elrendezésből származó adatokat áttanulmányozva megállapításokat kívánok tenni arra vonatkozóan, hogy az alkalmazott cukorpótló vegyületek milyen hatást gyakorolhatnak az OT hormon release-re.

II. Irodalmi áttekintés

Az emberi lét fenntartásához elengedhetetlen a cukorháztartás, ezen belül a cukorvegyületek megfelelő hasznosítása, felvétele a sejtek számára és az optimális energiaszint biztosítása a homeosztázis, kognitív funkciók fenntartására [8]. A mesterséges édesítőszer fogyasztása napjainkban nagyon megemelkedett, de a köztudatban már a XX. században jelen voltak. Ilyen elterjedt vegyület a **K-aceszulfám** is. Továbbá fontos megemlítenünk egy másik nagy csoportot a cukorhelyettesítőket, mint a cukorszármazékok egy csoportját, amelyek a szervezetben a cukortól eltérő módon hasznosulnak az anyagcsere-folyamatokban. Nagy csoportjuk a cukoralkoholok, amely vegyületek megtalálhatóak a természetben is, viszont szintetikus úton is elő tudjuk állítani őket [9]. Fontos megemlítenünk, hogy ezek a vegyületek nem a glükózzal ekvivalens módon állítják be a vércukor-, és inzulinszintet. Általában a glikémiás indexüket 9-10-es érték közé sorolják [7]. Itt meg kell említenünk, hogy ezeknek a vegyületeknek a fogyasztása előnyös lehet a cukorbetegség számára, és más olyan betegcsoportba tartozó emberek számára, akiknek a cukoranyagcserét érintő problémájuk van. E csoportba a **xilit**, **eritrit** tartozik [9], amit szakdolgozatomban szeretnék későbbiekben bemutatni, kísérleti eredményeinket akár ezen élettani funkciókra is extrapolálni.

II.1. A K-aceszulfámról

Ez az édesítő napjainkban nagyon elterjedt, fizikai tulajdonságaiban nagyon hasonló, mint a kristálycukor: fehér, kristályos por [5]. A vegyület felfedezését körülbelül az 1960-es évek közepéhez társítják, egy német vegyész Karl Clauss nevéhez fűződik. Későbbiekben (1978) az Egészségügyi Világszervezet (WHO) ezt az édes ízű anyagot jegyzékbe is vette [5]. Kémiai tulajdonságaiban a ciklamátok csoportjaihoz áll közel, pontos megnevezése: metil-oxatiazinon-dioxid-K (UPAC név: kálium, 6-metil-2,2-dioxo-1-oxa-2-λ-6-tia-3-azanidaciklohex-5-én-4-on). [5] Összegképlete: $C_4H_4KNO_4S$. A szulfámsav származékjaiból állítják elő, pontosan az amido-kénsavból. A háztartásokban használt étkezési cukornál, körülbelül 250-300-szor édesebb [5]. Ha nagyobb mennyiségben használjuk, könnyen egy savanyú ízérzetet kaphatunk. Felhasználási területei közé sorolhatnánk a cukormentes gyümölcs-, és zöldségkonzervek előállítását, édességipar és akár a gyógyszeriparban is előfordul alapanyagként [5]. Mesterséges besorolását az E 950-es számkódhoz társítják, ezt az élelmiszerekre vonatkozó szigorú törvényeknek megfelelően a K-aceszulfám tartalmú termékekre fel kell tüntetni. Fontos megemlítenünk, hogy más mesterséges vagy akár természetes édesítőszerrel is összekapcsolják, ilyenek például szacharinok, aszpartámok, ciklamátok. Vízben jól oldódik, pH változásra sem érzékeny, és például a konzerveknél azért is használják, mert hosszú tárolási idő után sem veszít az édes ízéből [5]. Megemlíthető azon tulajdonsága is, hogy az

élelmiszerekben lévő anyagokkal sem lép kölcsönhatásba. Bizonyos kutatások azt mutatták ki, hogy a K-aceszulfám nem metabolizálódik, eredeti formájában kiürül az emberi szervezetből a vesén keresztül. [5] A Magyar Élelmiszerkönyvben foglaltak alapján a még megengedett napi fogyasztását a 9,0 mg/tt. kg közé sorolják.

II.2. A xilitről

Ha a történeti áttekintését vesszük alapul, akkor azt mondhatjuk, hogy nagy valószínűséggel Franciaországból származhat, ahol nyírfából próbáltak cukrot kivonni a XIX. században [10]. Az 1950-es évekre tehető az az időszak, amikor a xilit vegyületet növényekben is felfedezték, mint természetes úton létrejövő anyag [10]. Fontos megemlítenünk, hogy több kutatási munkában is arról számoltak be, hogy ez a vegyület nem vált ki fiziológiás inzulinszint emelkedést [10]. Az Egyesült Államok Élelmiszer-, és Gyógyszerügyi Hivatala 1963-ban engedélyezte adalékanyagként [11]. A termékeken feltüntetve az E 967-es számkóddal találjuk. Mint már említettem ez a vegyület ($C_5H_{12}O_5$) a polialkoholok csoportjába tartozik (UPAC név: (2R,3R,4S) -pentán-1,2,3,4,5-pentol), glikémiás indexe 7, ebből következően lassan emeli meg a glükózszintet [11] a vérben. Oldódás szempontjából a vízben jelentősen, etanolban limitáltan oldódik. Élettani vonatkozásait sokan vizsgálták, megemlíthető, hogy a szájban lévő baktériumflóra kevésbé tudja hasznosítani, így nem tud fogszuvasodást okozni, mivel a mikroorganizmusok nem tudják anyagcsere folyamataikban hasznosítani ezt a vegyületet [12]. A bélhámsejteken keresztül szívódik fel a vékonybélben, viszont mint minden tápláléknál, itt is fontos az elfogyasztott mennyiség. A máj metabolizálja, utána a pentóz-foszfát útvonalon kapcsolódik be a glikolízisbe. Túlzott fogyasztásnál hasmenés vagy puffadás jelentkezhet, mivel lassabban ürül ki a szervezetből [10].

II.3. Az eritritről

Az előbb említésre került xilit mellett, az eritrit is a cukoralkoholok csoportjába tartozik, amit felhasználnak édesítőszerként mind az élelmiszeriparban, mind akár a gyógyszeriparban is [13]. Előállításával már a XX. században is foglalkoztak, de általánosságban megemlíthetjük, hogy fermentációs eljárásokkal állítják elő élesztőgombák segítségével [14]. Számos gyümölcsben is megtalálható, ilyenek például a körte, szőlő, görögdinnye. Fontos tény, hogy olyan cukorszármazék, ami a cukorbetegeknek, vagy túlsúlyos személyeknek alternatív cukorforrás lehet, mivel kis mértékben növeli meg a vércukor-, és inzulinszintet [15]. Számos vizsgálat itt is kimutatta, hogy a szájban élő baktériumok nem képesek lebontani, vagy felhasználni ezt a cukorvegyületet, így ez a vegyület sem idéz elő dominánsan fogszuvasodást [16], hasonlóan a már korábban bemutatott xilithez. Az elmúlt évtizedekben meglehetősen nagy arányban növekedett az eritrit ($C_4H_{10}O_4$) termelése az élelmiszeriparban (UPAC név: (2R,3S) -bután-

1,2,3,4-tetrol), a 2000-es évek körül már, mint egy 20 000 t-t is előállítottak évente. Kémiai tulajdonságaiban párhuzamot vonhatunk a többi cukoralkohollal, mivel ebben a vegyületben is hiányoznak olyan redukáló végcsoportok, amelyek miatt kifejezetten jó hő-, és pH változást tűrő. Viszont fontos megemlíteni, hogy molekulatömeg alapján ez a vegyület rendelkezik a legkisebb molekulasúllyal a többi polialkoholhoz képest. Antioxidáns tulajdonsága is van, melyet a diabetikus állapotra jellemző oxidatív stressz során, cukorbetegeken vizsgáltak [17]. Hiperglikémia által okozott vaszkuláris ártalmat is csökkentheti [17].

II.4. A sztíviáról

A sztívia az olyan édesítőszer-csoportjába tartozik, amely természetes energiát nem szolgáltat a szervezet számára, viszont a *Stevia sp.* fajokból kinyert molekula akár 200-300-szor édesebb a szacharóznál [18]. Ezeket a növényeket a XX. század közepén vizsgálták a kémikusok, akik az édes ízért felelős anyagot kinyerték belőlük. 1960-tól kezdve egyre több kontinensen kezdtek el termelni ezt a növényt, mivel helyettesíti a mesterséges cukorvegyületeket [20]. Mint a többi anyagnál itt is elmondható, hogy a tisztítás után a sztívia fehér, kristályos anyag. Élelmiszer előállításra alkalmas, mivel magasabb hőmérsékleten és magasabb lúgos pH-n bomlik el. Általában nem keverik a mesterséges édesítőszerekkel, leggyakrabban sóval tartósított élelmiszerekben használják, de édesítőparban, szeszes italok gyártásánál is alkalmazzák [19, 20]. Több tanulmány is megerősíti, hogy a szervezetből egy bizonyos része változatlan formában kiürül, a széklettel, vizelettel [19]. A bélflórában található baktériumok képesek elbontani, és olyan bomlástermékeket produkálnak, amelyek már felszívódhatnak (glükóz, szteviol). Nagyobb mennyiségben állatkísérletekben vizsgálták, amelyek eredményeiből megállapítást nyert, hogy a bélenzimeket befolyásolja, csökkenti a glükóz felszívódását [18]. Itt is megemlíthetjük, hogy a szájból lévő baktériumok nem tudják tápanyagként felhasználni, így fogszuvasodást nem okoz. A nemzetközi Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) a 2000-es évek közepén biztonságos besorolást adott ennek az anyagnak, így olyan betegcsoportok is tudják fogyasztani, mint a cukorbeteg és a magas vérnyomással rendelkező betegek. Napi beviteli mennyiség 4 mg/tt. kg [7].

II.5. A jelátviteli mechanizmusról

A munkám következő egységében a jelátviteli mechanizmus értelmezéséről kívánok szólni, ugyanis a sejtek közötti kommunikációban, és a sejt válaszokban kulcsfontosságú folyamatokról van, melyeket a környezeti expozítorok (pl. cukorpótló vegyületek) módosíthatnak. Amikor különböző katabolikus, anabolikus reakciókról beszélünk, akkor kiemelő az, hogy e reakciókat befolyásoló tényezők adott jelként funkcionálnak, amit a szervezetben található receptorok, felismerő egységek ingerületté alakítva továbbítanak az

expressziós központokba, ahol a megfelelő válaszreakcióhoz kapcsolt endogén molekulák iniciációja megkezdődhet. A környezetből érkező extracelluláris jeleket, és e jelek válaszreakcióit összességében *szignáltranszdukciónak* nevezzük [21, 22]. Esszenciális, hogy a szervezetben található szervek, sejtek rendelkezzenek olyan felismerő egységekkel, amelyek érzékelik a környezetből, vagy távolabbi szervekből érkező információkat. A sejtek közötti kommunikáció gyorsaságát és milyenségét többnyire kémiai anyagok biztosítják. Ezek az elemek általában hormonok, neurotranszmitterek, valamint növekedési faktorok lehetnek. A kémiai jelek tulajdonságai befolyásolják azt, hogy az adott receptoruk hol helyezkedik el. Fontos megemlítenünk, hogy az ilyen jellegű transzportfolyamatok energetikailag jól jellemezhetők, mivel a koncentráció gradiens (Δc) a szabadenergia változást mutatja, ami alapján *passzív* és *aktív* transzportokat különböztetünk meg [21]. A passzív transzport termodinamikailag spontán reakció, ami a magasabb koncentrációjú kompartment felől az alacsonyabb koncentrációjú egység felé irányuló anyagtranszportot jelent. A folyamat inverzére az a jellemző, hogy valamilyen más folyamatrendszerből fedezzük az energiaszükségletet. Ion-transzportnál a membrán két oldala között kialakult membránpotenciál lesz karakteres, és a membrán két oldala közötti potenciálgradiens alakulása szabja meg a rendszerben történő változás idejét. A membránba ágyazott transzmembrán fehérjék felelősek azért, hogy egy bizonyos szubsztrátot a membrán két oldala közötti térrészekből átvigyenek [23]. Vannak olyan transzporterek, amelyek egy időben több szubsztrátot képesek mozgatni, ezeket kotranszportereknek nevezzük. A sejtek plazmamembránjában helyezkednek el azok a glükóztanszporterek (GLUT) is, amelyek a sejtek számára a legfontosabb energiaforrást szállítják, azaz a glükózt. Például a GLUT1 transzporterek felelősek a vér-agy gáton átpumpált glükóz szintért is, ami az agy cukor ellátását biztosítja. Hipoxiás állapotban a GLUT1 fokozott mértékben expresszálódik, mivel a glükóz felvétel növekszik, és kompenzálja a lecsökkent oxidatív adenosin-trifoszfát (ATP) -termelést. Megemelkedett vércukorszint esetén a hexokináz/glükokinázok révén a glükóz foszforillálódik [21]. Továbbá itt kapcsolódik be az a fontos metabolikus útvonal is, hogy a táplálkozás révén megemelkedik a glükóz felvétel, és ezáltal a hasnyálmirigy β -sejtjei által termelt inzulin szint is. Ezeknél a folyamatoknál a szakirodalom GLUT2 transzportereket említi, viszont ezek egyes neuronokban is jelen vannak, és az étvágy, illetve a táplálék felvétel szabályozásban játszhatnak szerepet [24]. A szervezetünkben elengedhetetlen olyan folyamatok lejátsszódása, amelyek a kémiai elektropotenciálok alakulásának ellentétét mutatják, ezáltal energiafelhasználással aktív transzport valósul meg. Ehhez létfontosságú, hogy az ATP γ -foszfátjának hidrolízise megtörténjen. A nukleozid-foszfátok jelentősek az energia biztosításban, továbbá különböző

enzimek hatására foszforilálódnak, illetve defoszforilálódnak. Itt beszélhetünk egy foszforilációs potenciálról is, amelynek lényege, hogy a magasabb potenciállal rendelkező molekulák képesek további foszforcsoportokat felvenni, továbbítani [25]. Leginkább az oxidatív foszforiláció révén, oxigén jelenlétében, a mitokondriumban szintetizálódik az ATP. Ennek párja a szubsztrátszintű foszforiláció, ahol magasabb foszforiláló potenciával rendelkező vegyületek adják át közvetlenül az adenozin-difoszfát (ADP) molekuláknak a γ -foszfátcsoportot.

Munkánk során a cukorpótló vegyületek által indukált hatásokat vizsgáljuk, így a következő témában az olyan tirozin-kináz receptor-családokat, plazmamembrán receptorok jelentőségét is tanulmányozzuk irodalmi feltárással, amelyek szerepet tölthetnek be a cukor, cukor analóg vegyületek emésztésének élettani hatásaiban. Ezek olyan integráns membránfehérjék, amelyek rendelkeznek transzmembrán szakasszal. A receptor ligandkötő helye a fehérjének a sejten kívüli részén helyezkedik el, míg a tirozin-kináz domén a sejten belüli részen található, emellett még megtalálhatók azok a helyek is, amelyek a foszforilálható tirozinokat tartalmazzák. A ligand kötéskor dimerizálódnak az inaktív receptorok [26]. A metabolikus szabályozás szempontjából az inzulin jelpálya is fontos. Ezek a receptorok inaktív állapotban is dimerként vannak jelen (hidrogén-híddal kapcsolt), továbbá két α és β láncból épülnek fel. A receptor β -alegységén található a tirozin-kináz-domén és a tirozinfoszforilációs hely, ahol foszforiláció megy végbe. Az α -alegységekhez az inzulin hormon kapcsolódhat, ekkor egy olyan konformációváltozást idéz elő az egész rendszerben, hogy a β -alegységek tirozin-kináz-doménjét aktiválják, így lezajlik több tirozin oldalláncon a receptor autofoszforilációja [26]. Ezáltal dokkoló fehérjék (inzulinreceptor-szubsztrát) tudnak hozzákapcsolódni az eddigi blokkhoz. Ez a szubsztrát fog olyan folyamatokat beindítani, amely által az inzulin metabolizmusa, valamint a sejtpoliferáció végbe tud menni. Továbbá vannak olyan faktorok (interferon, eritropoetin, prolaktin) amelyek nem rendelkeznek enzimaktivitással, így citoplazmatikus oldalon inaktív *Janus*-kinázokkal (JAK) kapcsolódnak össze. Ezek nincsenek beágyazva a plazmamembránba, viszont ligandkötés hatására dimerizáció történik, ezt követően a JAK protein-kinázok egymást foszforilálják, ennek köszönhetően az aktivációjuk is megtörténik [28]. Az aktiválódott JAK tirozin-oldalláncon foszforilálja a receptort, így a SH2-doménnel rendelkező szignál transzducér és transzkripció aktivációs protein (STAT) hozzá tud kapcsolódni. A STAT maga a szubsztrátja a JAK rendszernek.

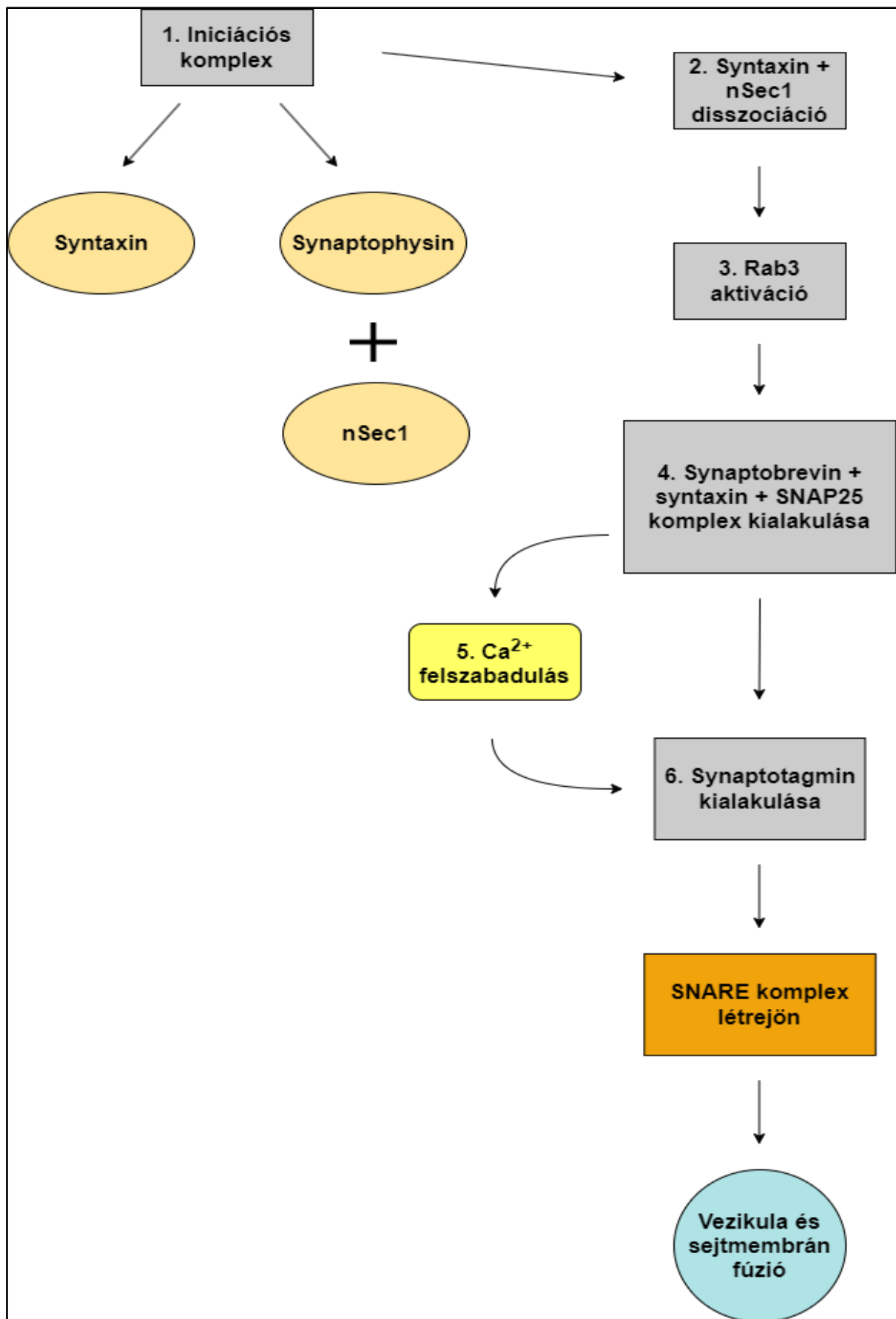
II.6. Az exocitózis mechanizmusa, energiaigénye

A hormonvezikulák sejtéből történő felszabadulása energiát igénylő folyamat, amely származhat a cukoranyagcsere termékeiből is, ezért a következő fejezetben az exocitózis mechanizmusát

kívánom feltérképezni. Az exocitózis folyamatában jelentős lépés az, amikor a szekretoros vezikulák a plazmamembránnal fuzionálnak. Ennek mechanizmus szintű bemutatását valósítom meg a következőkben. A vezikulák és plazmamembrán fúziója Ca^{2+} igényes, és a folyamatban számos fehérje is kitüntetett szereppel bír [29, 30, 31, 32]. Az egyik ilyen molekulacsald a szolubilis N-etil-maleimid-szenzitív faktor-kötő fehérje receptor (SNARE), amely involválja a plazmamembrán asszociált proteineket, így a syntaxint, a szinaptoszóma asszociált proteint (SNAP25), valamint a szinaptobrevint [29]. A rendszerben más jól konzervált enzimek is jelen vannak, így megtalálható a SNAP25 adaptor proteinje ATPáz formájában, valamint megtalálhatóak kis G-proteinek (GTPáz aktivitású molekulák), amelyek a synaptotagmin effektor proteinjei, amely pedig a RAS-asszociált kötő protein (Rab) molekulacsaldba tartozik [31]. A Rab3 molekulák alapvetően a vezikuláris membrán körforgását biztosítják, tehát szerepük van abban, hogy a vezikuláris membránba csomagolt oxitocin fehérjék membrán fúziójuk és kiürítésük után a membránról lefűződhessenek, és a sejt építőegységei újra felhasználhassák. Ezek alapvetően két folyamatot vezérelnek: **1.** vezikuláris transzportot az endoplazmatikus retikulumról a Golgi-ba, **2.** Golgi-poszt vezikulák sejtmembránnal való asszociációja. Fontos egység még továbbá az nSec1 fehérje (syntaxin chaperon funkcióval rendelkezik), a komplexin fehérje, a synaptobrevin-kötő protein (VAP33), valamint a synaptophysin is [31].

A mechanizmus a következő hálózat mentén játszódik le [32], lásd 1. ábra:

1. lépésben a syntaxin membránfehérje hozzákapcsolódik a synaptophysin, valamint az nSec1 egységekhez, létrehozva az iniciációs komplexet,
2. lépésben a [syntaxin-nSec1] -komplex disszociál,
3. lépésben a disszociált komplex működésbe hozza az effektor fehérje Rab3-at,
4. lépésben a synaptobrevin hozzákapcsolódik a syntaxinhoz, valamint a SNAP25 proteinhez,
5. lépésben a rendszer elemeiből álló fehérjekomplexek (a sejtmembrán és a vezikula) fuzionálnak egymással, amely jelentős Ca^{2+} felszabadítást eredményez, ezzel pedig a molekulák egymással dokkolni lesznek képesek (a Ca^{2+} binding fehérje a synaptotagmin lesz),
6. lépésben az α - SNAP az N-etil-maleimid-szenzitív faktor (NSF) hozzákapcsolódik a komplexhez, ezáltal alakul ki a SNARE komplex.

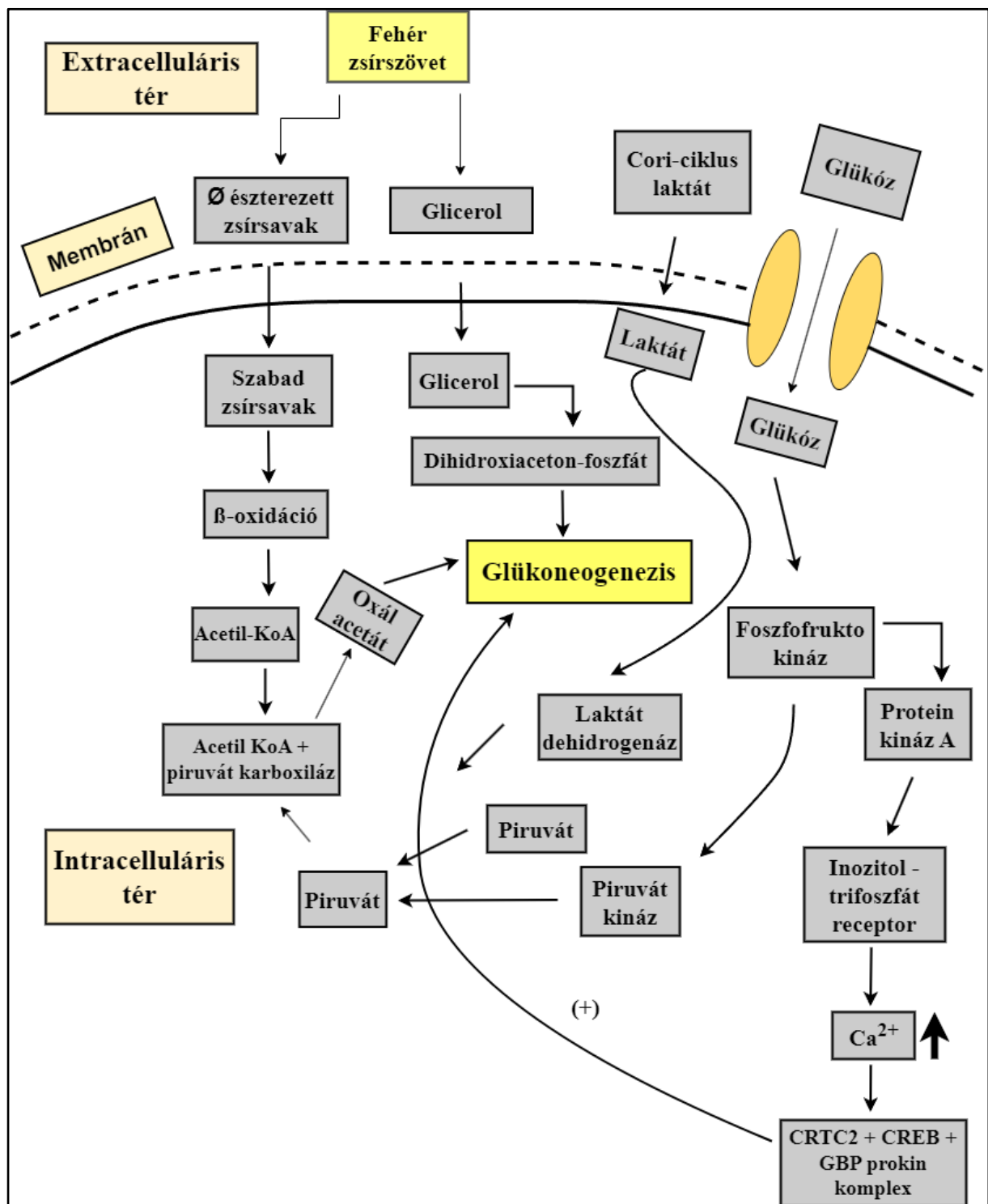


1. Ábra: Az exocitózis folyamata

Mindezen folyamatok fontosok lesznek, ugyanis a vizsgált oxitocin hormon felszabadulása is a pituicitákból, a neurohipofízis sejtjeiből exocitózis útján valósul meg. A folyamat energiaigényes, ugyanis a hormon tartalmú vezikulák plazmamembránnal való fúziója és tartalmának extracelluláris térbe való ürítése, majd a membrán reorganizációja az ismertetett folyamatokon keresztül megy végbe [30].

II.7. Cukor homeosztázis sejtbiológiai folyamatai

A glükóz-energia homeosztázis központi idegrendszeri kontroll alatt áll, ugyanis a központba érkező szignálok a táplálékfelvétel útján, valamint leptin szignalizáció útján működnek. A rendszer a májat glükóz produkcióra, az izomzatot glükóz hasznosításra, a pankréaszt inzulin szekrécióra utasítja [33]. Az energia a glükóz átalakításából származik és ez felhasználhatóvá válik a hormon tartalmú vezikulák extracelluláris térbe való ürítésére. Az olyan afferens szignálok is fontosak, amelyek pl. a leptin vagy inzulin által közvetített útvonalon a megfelelő agyi struktúrákban olyan üzeneteket továbbítanak, hogy az energia raktárakat ürítse ki vagy töltsen fel a szervezetet. Mindebben a glükóz, szabad zsírsavak szignalizációja tehát esszenciális szerepű lesz [33]. A tápláléktöbblet, vagy az energia raktárak feleslege olyan agyi jeleket iniciálnak, amelyek promotálják a (-) energia egyensúlyt és limitálják a glükóz felhasználását. Alapvetően az inzulin és a leptin azok az elemek, amelyek az agyi struktúrákban (-) feedback szabályozóként működnek, tehát ez azt is jelenti, hogy a kulcsfontos agyi struktúrákban megfelelő receptorokkal rendelkeznek [34]. A glükóz homeosztázis folyamatát a 2. ábra szemlélteti.



2. Ábra: A glükóz metabolizmus folyamata

A leptin jelátvitel JAK szignál transzducer és transzkripció aktivátor protein (STAT) útvonalon keresztül játszódik le [35]. A leptin receptor egy extracelluláris ligand kötő receptor, amely rendelkezik transzmembrán doménnel és citoplazmatikus jelátviteli doménnel is. Ez a receptor az interleukin-6 receptorcsalád tagja, melynek több altípusa is van, de az energia homeosztázisba a LeptinRb receptorok kapcsolódnak be [34]. Leptin és a receptor kapcsolódás

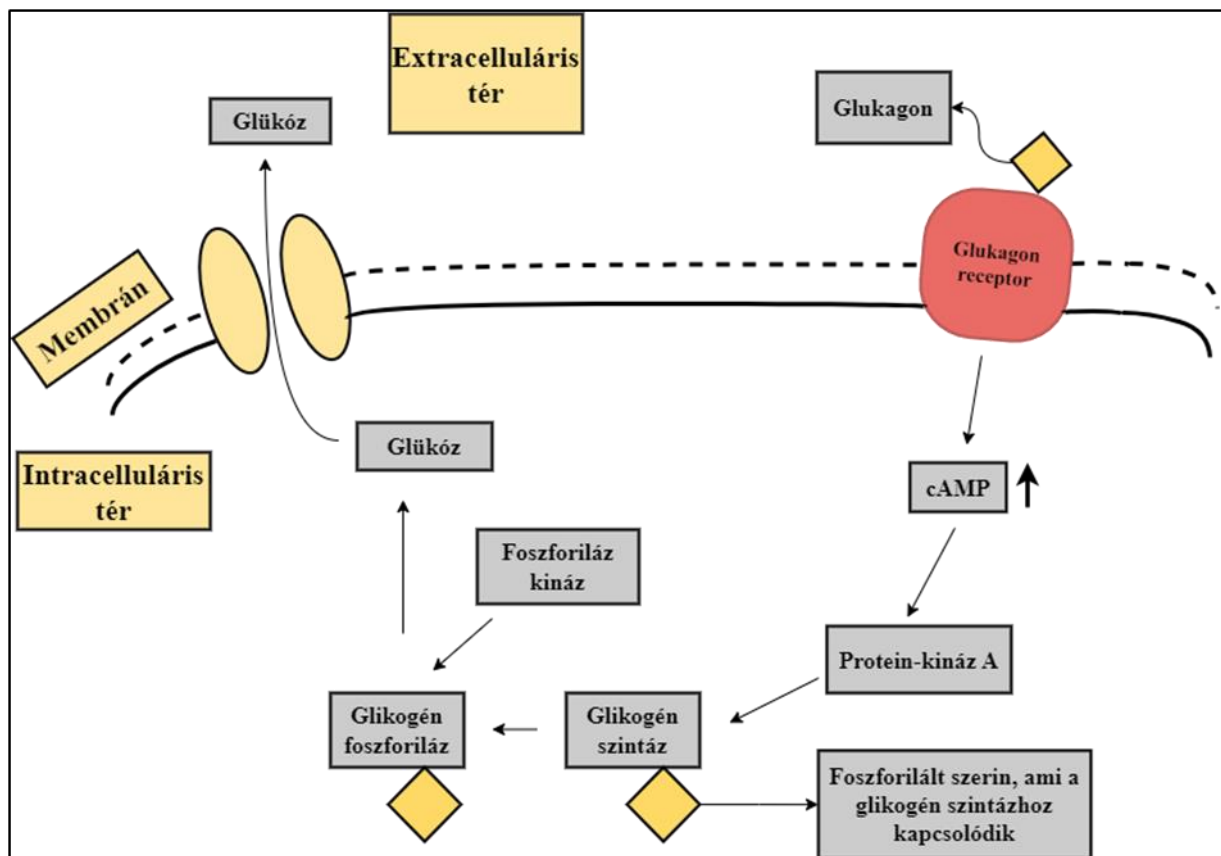
eredményeképpen a JAK2 protein kerül aktivált állapotba, amely 3 tirozin foszforilációval 3 különböző mechanizmust aktivizál [36]:

1. *tirozin foszforiláció*: SHP2 aktiváció, amely az ERK jelátviteli utat mediálja,
2. *tirozin foszforiláció*: STAT3 dimerizációját váltja ki, amely ettől aktivált állapotba kerül, majd transzlokálódik a nukleuszba,
3. *tirozin foszforiláció*: STAT5 protein dimerizációját aktiválja, ezáltal pedig a nukleuszba való áthelyeződése megvalósulhat.

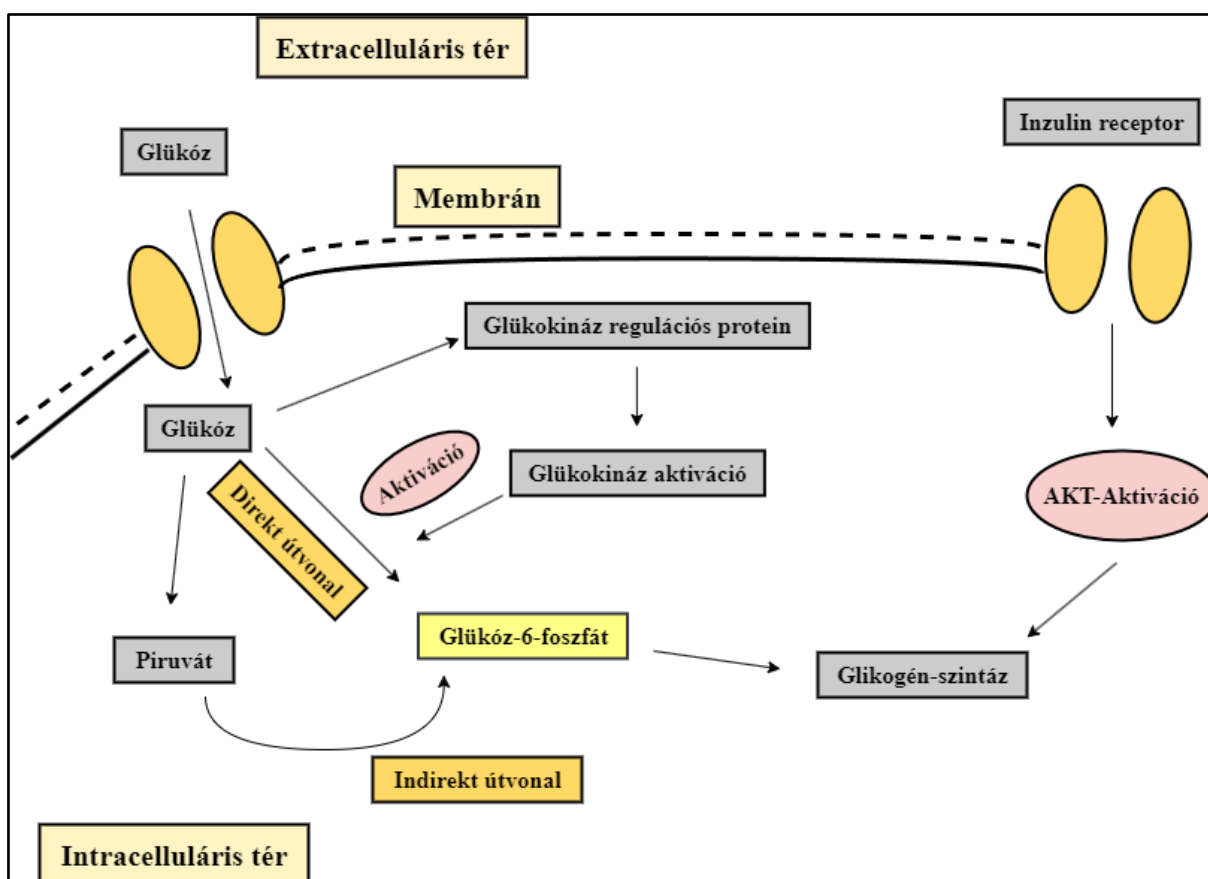
Az inzulin receptor (IR) szintén fontos jelátviteli mechanizmust fog jelenteni ebben a viszonyrendszerben [37]. Az inzulin a központi agyi területeken lévő receptoraihoz kapcsolódva hiperpolarizálni fogja a glükóz-válasz érzékeny neuronokat (akár a neurohipofízis neuronjait). IR aktiváció eredményeképpen az inzulin receptor szubsztrát (IRS) a citoplazmában aktiválódni fog, amely a foszfatidil-inozitol-3 kináz (PI3K) szignáltranszdukciós útvonalat fogja mediálni [38]. PI3K aktív állapotában további foszfatidil-inozitol receptorokat hoz működésbe, így például a PIP2-t, PIP3-t, melyek aktiválják a foszfatidil-inozitol-dependens protein kináz-1 (PDK1) molekulát. Mindez intracelluláris kapcsolati hálózatot mutat. A PDK1 a protein kináz-B molekulát (AKT) lendíti működésbe, amely foszforilálja, ezáltal aktiválja a Rapamycin (mTor) proteint [38]. Ha a leptin jelátviteli utat vizsgáljuk meg, akkor végső eredményben szintén mTor aktiválás valósul meg, a következő módon [39]. Leptin receptorához kapcsolódva a JAK2 proteint dimerizálja, ezáltal működésbe hozza, továbbá a STAT3 proteint foszforilálja, és az így transzlokálódik a nukleuszba, hogy a megfelelő célgéneket átírja (citokin szignalizációs 3 szupresszor (SOCS3) gének átírása valósul meg). A JAK2 további foszforilációban szintén PI3K modulációt idéz elő, mely AKT aktiválással mTor protein működést generál [39].

De miért is fontos, hogy az mTor működésbe lépjen a glükóz homeosztázis kapcsán? Ez a protein a metabolizmus fenntartásáért felelős szignáltranszduktor feladattal bír, azaz a tápanyagok felhasználásának, energia útvonalak optimalizált működésének, valamint az O₂ ideális felhasználás mediátor fehérjéje [40]. Elsősorban a májban, izomzatban, emellett a fehér és barna zsírszövetben működik erős intenzitással ez a protein [40]. Alapvetően a hepatikus glükóz metabolizmus felelős a normál glükóz homeosztázis fenntartásáért (lásd 3. ábra). A mechanizmusok számos hálózati kapcsoltságot mutatnak, többféle útvonalakon keresztül mehetnek végbe. A fehér zsírszövet lipolízise az egyik lehetőség, amely az energiaszabályozásba kapcsolódik [21]. A lipolízis által nem észterezett zsírsavak szabadulnak fel, melyek a sejtek membránjain átjutva szabad zsírsavakká alakulnak és a mitokondriumba bejutva a β -oxidáció eredményeképpen acetil-koenzim-A segítségével a mitokondrium

energiatermelését szabályozzák [21]. Ugyanakkor a lipolízis során glicerol is felszabadulhat, mely a sejtek citoplazmájában a dihidroxiaceton-foszfát enzim segítségével a glükoneogenezisre fordítható, ehhez a mechanizmushoz köthető az is, hogy a mitokondriumból oxálacetát szabadulhat fel a citoplazmába, mely szintén a glükoneogenezist támogatja [21]. A Cori-ciklusból származó laktát a citoplazmába kerülve a laktát dehidrogenáz enzim katalízisével piruváttá alakul, amely a mitokondriumban energia szintézisre fordítódik. A glükóz, glükózcsatornákon keresztül jut a sejtplazmába, ahol a foszfo-frukto kináz/fruktóz-biszfoszfátáz által, majd a máj eredetű piruvát-kináz közreműködésével alakul piruváttá [41]. A fruktóz-biszfoszfátáz által katalizált mechanizmus aktiválja a protein-kináz-A proteint, amely pedig az inozitol-trifoszfát receptort aktiválja, ami jelentős Ca^{2+} többletet valósít meg a sejtplazmában. Ez a folyamat olyan fehérjéket aktivál, amik hatással vannak a cAMP szintre, a glükoneogenezisre, illetve protein-kináz-1 enzimeket hoz működésbe, így bekapcsolódik a glükóz homeosztázisba [21].



3. Ábra: A hepatikus glikogén metabolizmus: éhezés alatt



4. Ábra: A hepatikus glikogén metabolizmus: étkezés során

II.8. Az oxitocin hormon szerepe és jelentősége

Munkámban a folyamatok komplexitását is igyekeztem bemutatni, ezért a cukorpótló vegyületek hatásait *in vitro*, OT hormon elválasztásával megvalósító neurohipofízis sejtek kultúrájával vizsgáltam. Az OT 9 aminosavból álló peptidhormon, melynek szekvenciája: tirozin-izoleucin-glutamin-aszparagin-cisztein-prolin-leucin-glicin aminosavakból tevődik össze [42]. Az OT szabályozza a szülési folyamatokat és a tejelválasztást. Ezenkívül a pszicho-neuroendokriniumban is működik, mivel összekapcsolja a társas viselkedési formákat, amelybe például beletartozik az anya-csecsemő kötődés, társadalmi elismerés, párkapcsolatok [43]. Az OT azért is jelentős, mert, ha a társadalmi szinten is értelmezzük az alkalmazkodást, akkor azt mondhatjuk, hogy a humán homeosztázis pszicho-immuno-endokrin aktivitással fenntartott. A pszichogén aktivitás (pl. kognitív, affektív elemek) a biogén aktivitási komplexitásba ágyazottan, azaz a neuroendokriniumba ágyazottan jelenik meg. Az OT simaizom kontrakciós szerepe alaposan feltárt terület, azonban emellett az emberi szociális viselkedés effektor neuropeptidjeként is ismeretes, így a kötődés, a bizalom, a kognitív tulajdonságok, valamint az empatogén tulajdonságok mediálásáért is felelős kreatív elem [43]. A tanulási folyamatokban megerősíti az explicit tanulás során a memóriához kapcsolható emléknymot. Szakirodalmi

adatok azt igazolják, hogy az OT elősegítheti a pozitív proszociális viselkedést is, azáltal, hogy szerepet játszik a bizalom és az altruizmus jelenségében is [44]. Főemlősökön és nem főemlősökön végzett állatkísérletek igazolták, hogy az OT szerepet játszik proszociális magatartás szabályozásában, valamint szorongásoldó hatása is van, e tulajdonsága humán vizsgálatokkal is korrelál [45]. Emberben intranazálisan adagolva a szorongás, szociális szorongás tüneteinek csökkenését figyelték meg [45,46]. Azonban rendszer szinten vizsgálva e hormon szerepét igazolták a nátriuretikus peptid szabályozásában is, ugyanis OT-erg neuronok aktivációja aktiválja a szívpitvari OT-receptorokat, melyek a nátriuretikus peptid hormon felszabadulását váltják ki. Megfigyelt tény az is, hogy a magzati szív fejlődése során a jelentős mennyiségű OT mutatható ki e szövetekből, valamint képes arra is, hogy stimulálja a kardiomiocitákat is [47]. A NA-erg rendszer aktiválódása kritikus szereppel bír az OT felszabadulása szempontjából [48].

III. Módszerek

III.1. *In vivo* kísérleti elrendezés

Kísérleteinkhez leletezett hím (a kísérletek kezdetén 200-250 g tömegű, 4-6 hetes), Wistar törzsű patkányokat használtunk (Charles River, Isaszeg, Magyarország). A kísérleti periódus alatt az állatokat kontrollált körülmények mellett (55-65 %-os relatív páratartalom, 22 ± 2 °C léghőmérséklet), automatizált 12 h nappali, 12 h éjszakai megvilágítási ciklusok között (diurnális rendszerben), 32x40x18 cm méretű ketrecekben tartottuk (ketrecenként 5 állat). A kísérleti állatok számára szükséges táplálék (CRLT/N, Charles River, Magyarország) és ivóvíz *ad libitum* állt rendelkezésre. A standardizált kísérleti protokoll alapján végzett vizsgálatokba bevont állatokat a laboratóriumi állatokra, valamint a kísérleti eljárásokra vonatkozó, 40/2013. (II. 14.) Korm. rendelet az állatkísérletekről, valamint az 1998. évi XXVIII. törvény az állatok védelméről és kíméletéről szóló jogi anyagok tiszteletben tartása mellett végeztük.

Kísérleteinkben ♂ Wistar patkányokat kezeltünk K-aceszulfám: 40,0 mg/tt. kg, eritrit 0,05 g/500 cm³, xylit: 40,0 mg/tt. kg/nap, és sztívia: 40,0 mg/tt. kg/nap dózisban 16 héten keresztül.

III.2. *In vitro* kísérleti protokoll

A kezelési protokoll végpontjaiban monolayer neurohipofízis sejt kultúrákat készítettünk: enzimatis és mechnaikus disszociáltatás útján (tripszin 0,2 % /Sigma Aldrich, USA, St. Louis/: 30 min; kollagenáz /Sigma Aldrich, USA, St. Louis/: 30 µg/cm³, 40 min; diszpáz / Sigma Aldrich, USA, St. Louis/: 50 µg/cm³, 40 min, foszfát pufferben /PBS-ben, pH=7,4/), Ø: 83 és 48 µm átmérőjű szöveten mechanikailag disszociáltattuk a sejteket, majd 37°C-on inkubáltuk a sejt kultúrákat. A sejtek viabilitás (≥ 95 %, tripán-kék festés alapján) kontrollja után a sejtdenzitást 2x10⁵ sejt/ml- re állítottuk be, a sejtszámot Corning Cell Counter segítségével határoztuk meg. A konfluensé váló tenyészeteket 3 naponta mostuk Dulbecco's Modified

Essential Medium (DMEM, Sigma Aldrich, USA, St. Louis) cseréjével. Neurohipofízis (NH) sejtkultúrákat önkontrollos rendszerben is kezeltük 10^{-6} M -os koncentrációs dózisban noradrenalin (NA), emellett a bemutatott cukorpótló vegyületekkel kezelt NH kultúrákat is vizsgáltuk e monoaminnal.

III.3. Hormonmeghatározás

Az OT tartalmat a monolayer sejtkultúrák felülúszó médiumából határoztuk meg (Abcam OT ELISA kit- ab133050) ELISA módszerrel. Thermo Fisher Scientific Multiscan MCC Microplate Reader-rel (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, USA) határoztuk meg a protein tartalmat, továbbá Lowry-módosított módszerét is alkalmaztuk az összefehérje mennyiség vizsgálatához. A felülúszó médiumot -20°C -on tartottuk a minta feldolgozásáig. A protein tartalom meghatározáshoz a Pierce™ BCA Protein Assay Kit-et használtuk (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, USA).

III.4. Statisztikai elemzés

Az adatok elemzését ANOVA módszerrel végeztük ($n=5$). Eredményeinket átlag $\pm$ standard hiba (SEM) formában tüntettük fel. A csoportok vonatkozásában: kontroll, cukorpótló kezelés, valamint cukorpótló kezelés + 10^{-6} M NA kezelés eredményeinek értelmezésekor a különbségek akkor kezeltük szignifikánsan, ha $p<0,05$ volt.

III.5. Egyéb módszerek

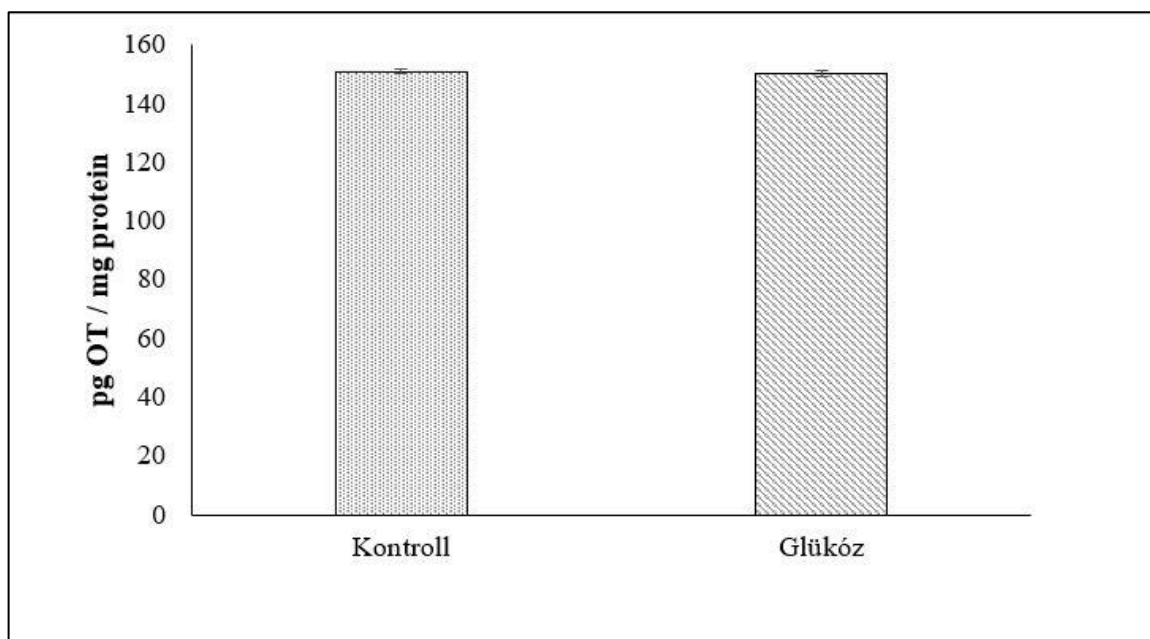
Dolgozatomban hiteles szakirodalmi feltárást végeztem, az irodalmi feltárás adatbázisa a PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) keresőalgoritmusával történt. Kulcsszavas keresést végeztem a szakirodalmi feltárásában, melyek a következők voltak: K-aceszulfám, eritrit, xilit, sztívia, cukoranyagcsere, oxitocin, exocitózis. Munkámban a folyamatok áttekintése érdekében folyamatábrákat készítettem (draw.io) programmal, valamint az eredmények ábrázolásához diagramokat készítettem (MSExcel 2016) program felhasználásával.

IV. Eredmények

A dolgozatom következő fejezeteiben a cukorpótló vegyületek és az *in vitro* OT release változásokat kívánom prezentálni. A hormontartalom kifejezésére pg OT/mg protein dimenziót használtunk, az adatokat $\text{átlag} \pm \text{SD}$ formában tüntettük fel. Méréseink fókuszpontjába azt a koncepciót helyeztük, hogy a különböző cukorpótló vegyületek milyen hatással vannak az OT realese-re. Az emberi homeosztázis fenntartásához esszenciális a glükóz, mint fő energia szolgáltató vegyület. A molekula megfelelő hasznosulásának, és az ehhez kapcsolódó anyagcsere folyamatoknak összhangban kell lennie. Viszont ismerünk számos olyan anyagcserezavarral összefüggő egészségügyi problémát, amelyek indokoltta tehetik, hogy olyan vegyületeket fogyasszanak a betegek, amelyek analógiát mutatnak a glükózzal. Eredményeink kiértékelése és kritikus megvitatása központi jelentőségű jelen vizsgálati kontextusban.

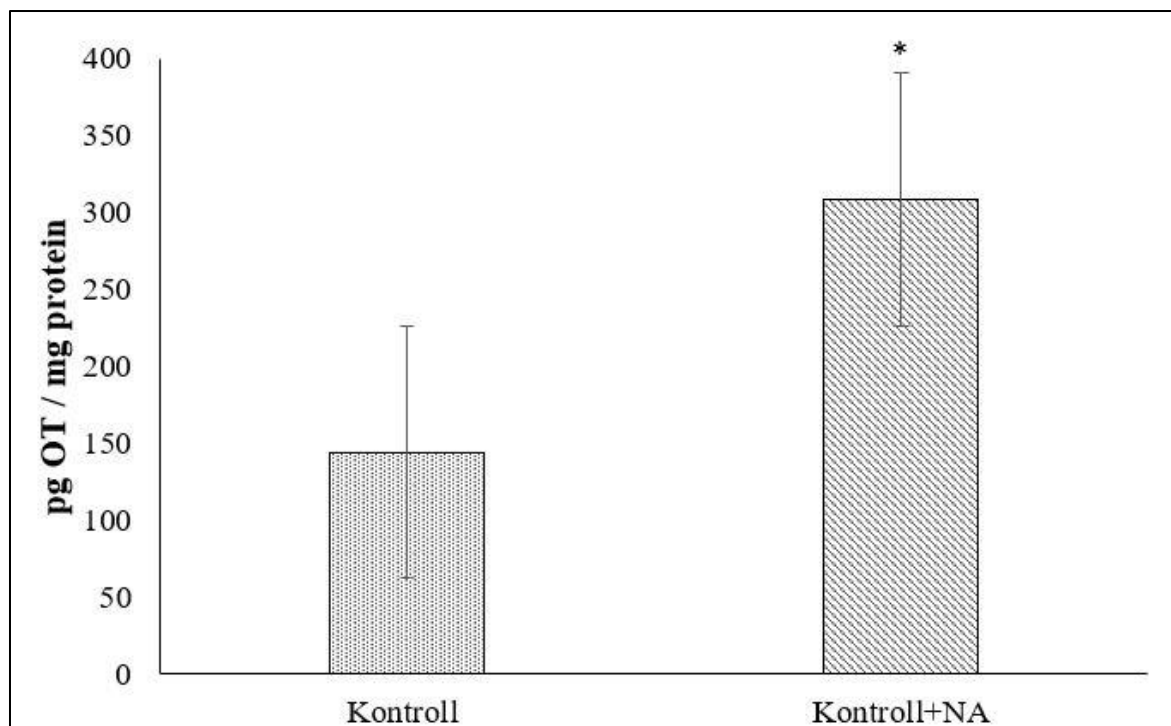
IV.1. A modell alkalmasságának igazolása

Az 5. eredményábrán látható, hogy *in vitro* tenyészetben az OT hormon koncentrációja a glükózzal kezelt és a kontroll (kezeletlen) csoportban nem mutat szignifikáns különbséget.



5. Ábra: Hormonelvásztás *in vitro*, glükóz és kontroll csoport viszonyában ($\text{átlag} \pm \text{SD}$, $n=5$)

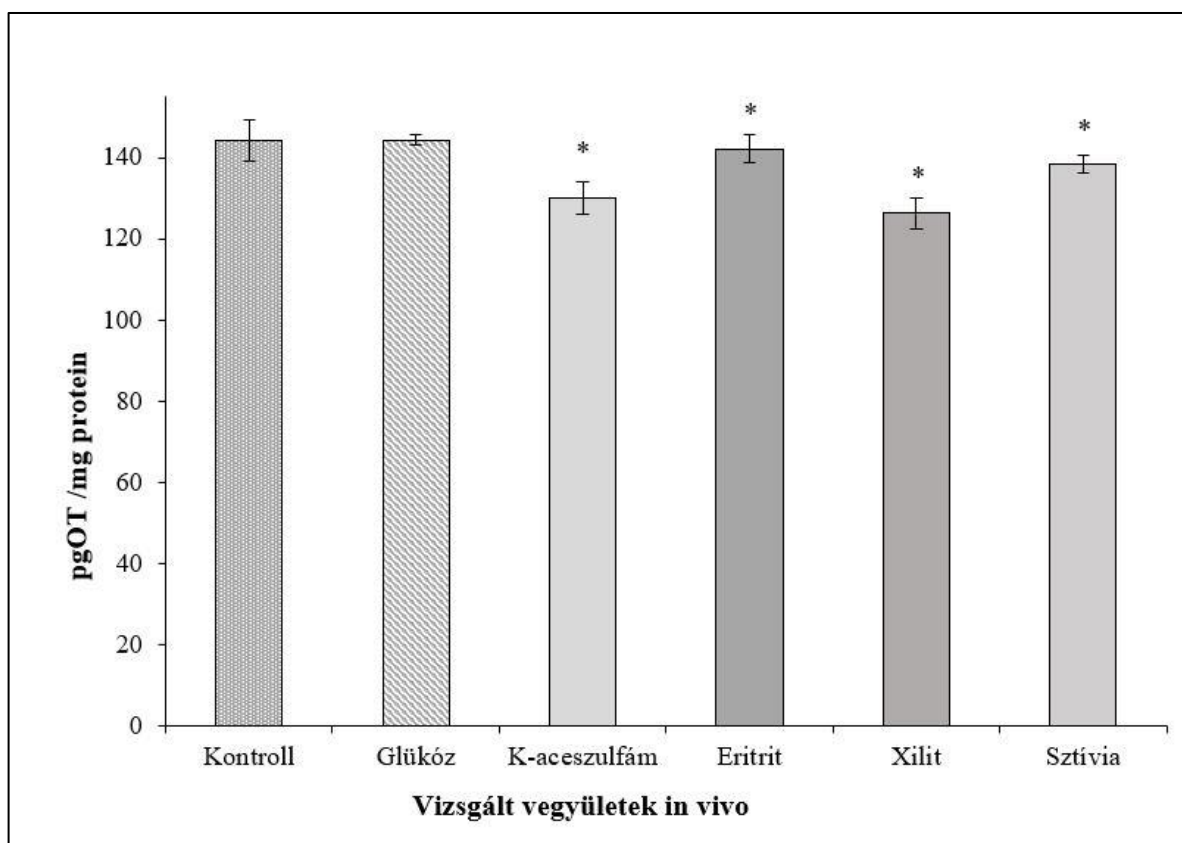
A modell alkalmasságát is szükséges elemezni, amennyiben biomérnöki szemszögből vizsgáljuk a kérdést. Ebben a relációban fontos az, hogy aktiváció eredményeképpen, hogyan reagál a modell. A 6. ábra adataiból jól látható, hogy NA aktiváció ($308,3 \pm 7,10$ pg OT/mg protein) eredményeképpen a hormon release szignifikánsan emelkedett a kontroll ($144,26 \pm 5,07$ pg OT/mg protein) csoporthoz viszonyítva, $p < 0,05$ volt.



6. *Ábra:* Kontroll és NA aktivált OT hormon elválasztás egymáshoz viszonyított értéke
($\text{átlag} \pm \text{SD}$, *: $p < 0,05$, $n=5$)

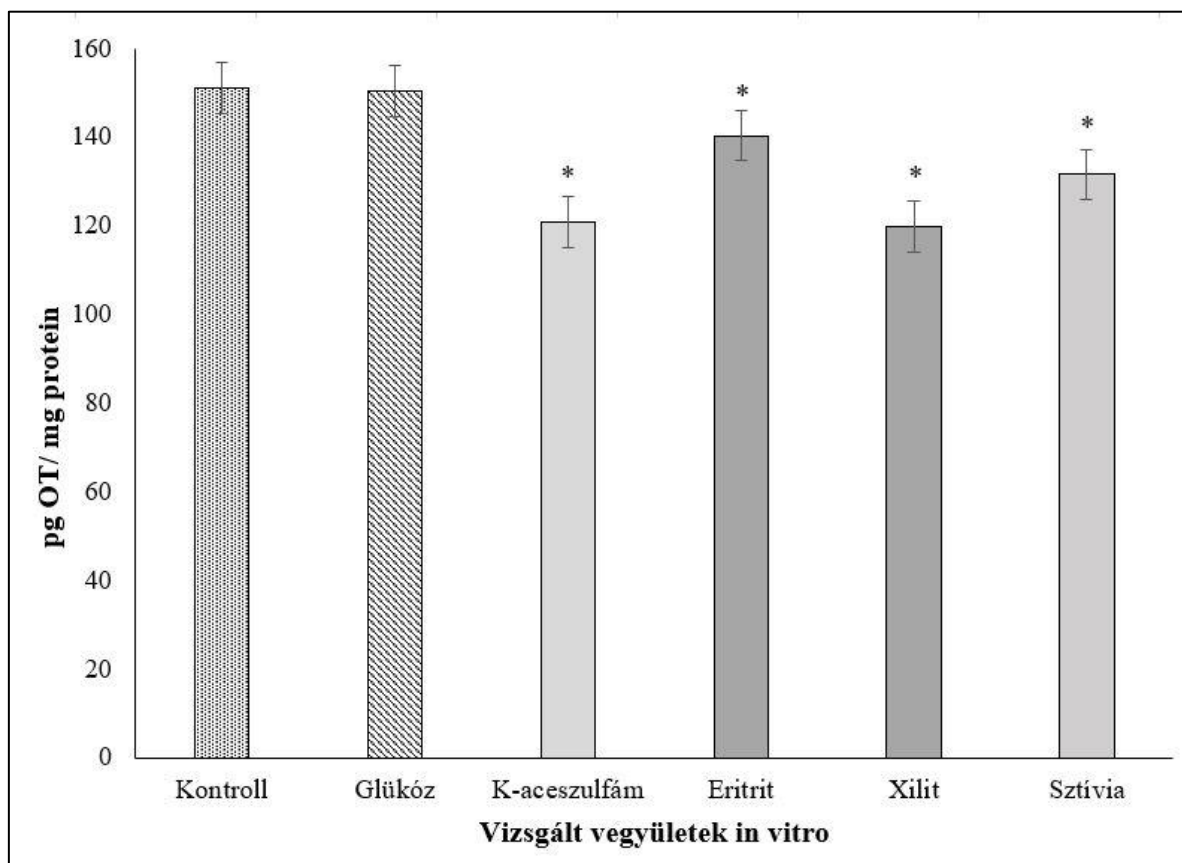
IV.2. A cukorpótló vegyületek expozítor hatásai *in vitro* sejtkultúra modellben

A 7. ábrán látható, hogy a K-aceszulfám esetében ($130,03 \pm 3,88$ pg OT/mg protein) szignifikáns eltérés van a kontroll csoporthoz képest ($144,26 \pm 5,07$ pg OT/mg protein) ($p < 0,05$). A cukorpótló vegyületek közül a legkisebb eltérést az eritrit mutatja ($142,1 \pm 3,47$ pg OT/mg protein) a kontroll csoporthoz képest. A xilit kezelés adatai ($126,3 \pm 3,91$ pg OT/mg protein) csökkenő értékben térnek el a kontroll csoporthoz képest. A sztíviával kezelt csoport adatai alacsonyabb hormon release-t eredményeztek ($138,5 \pm 2,25$ pg OT/mg protein) a kontrollhoz képest. A 7. ábrán látható adatok azért fontosak, mert az *in vitro* tenyészetek az *in vivo* előkezelt Wistar patkányok neurohipofiziseiből készültek.



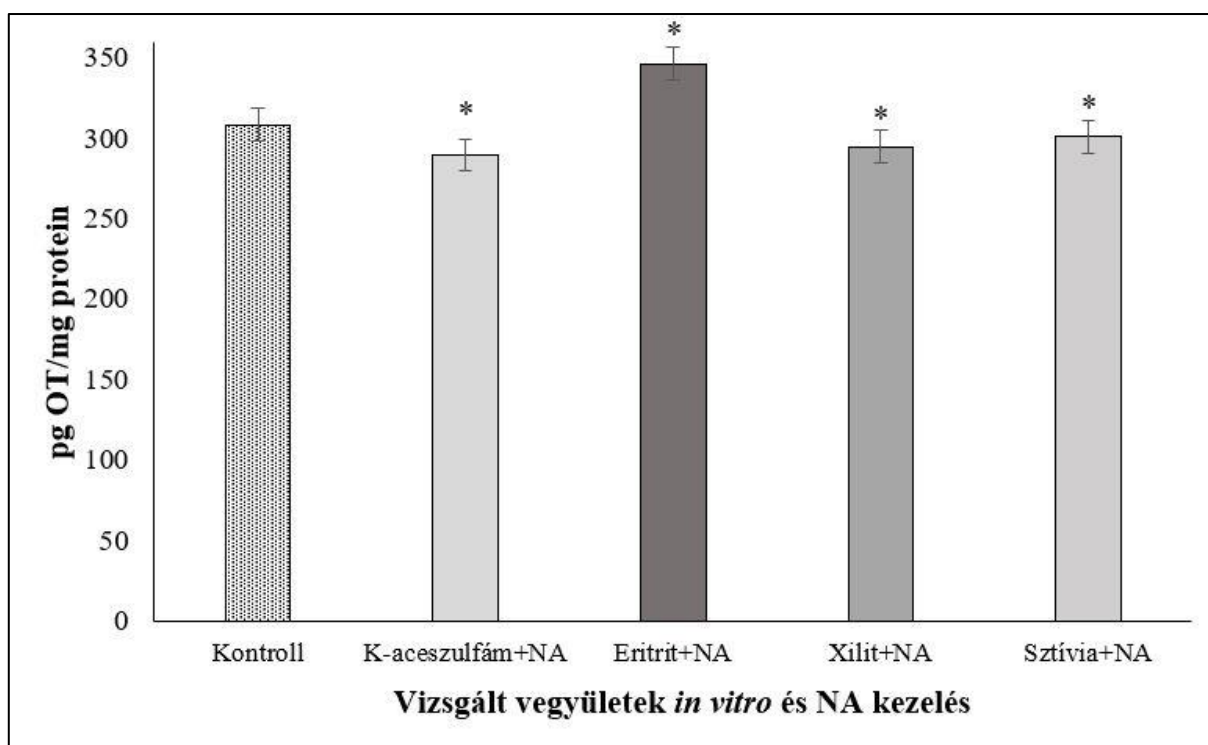
7. **Ábra:** *In vivo* cukorpótló vegyületekkel kezelt Wistar patkányok hipofízis kultúráinak spontán OT hormonelvásztása (átlag $\pm$ SD, *:p<0,05, n=5)

A 8. ábrán látható, hogy az *in vivo* előkezelt, majd *in vitro* tenyésztett sejt kultúrákhoz további cukorpótló ágenseket adtunk, a kezelést és a vizsgálatot 120 perces időtartamban végeztük. Megfigyelhető, hogy a K-aceszulfám (120,86 $\pm$ 1,34 pg OT/mg protein) és a xilit (119,83 $\pm$ 6,69 pg OT/mg protein) csoport értékei szignifikánsan (p<0,05) eltérnek a kontrollhoz (151,03 $\pm$ 2,059 pg OT/mg protein) képest. A sztívia (131,63 $\pm$ 3,23 pg OT/mg protein) cukorpótló vegyület átlagértéke ez esetben kevésbé tér el a kontrollhoz képest, mint a K-aceszulfám és xilit. Az eritrit (140,33 $\pm$ 1,10 pg OT/mg protein) értéke tér el a legkisebb mértékben a kontroll csoporthoz viszonyítva.



8. **Ábra:** *In vivo* cukorpótlás után, további *in vitro* cukorpótló ágensek hatása (akut 120 perc) az OT release alakulására NH kultúrákban (átlag $\pm$ SD, *:p<0,05, n=5)

Mivel szabályozási körben dolgozunk, ezért fontos, hogy megvizsgáljuk, milyen változás történik, ha az *in vitro* sejt kultúrákhoz egy regulátor elemet adunk, jelen esetben ez a 10^{-6} mM NA volt. Ezen sejt kultúrából származó, mért adatokat a 9. ábrán figyelhetjük meg. Látható, hogy maga az adatokban is történt egy ugrásszerű fluktuáció, a kontrollhoz (308,3 $\pm$ 7,10 pg OT/mg protein) képest, például az eritrit+NA (346,26 $\pm$ 6,58 pg OT/mg protein) sejt kultúra csoport nagyobb mennyiségben választott ki OT hormont. A K-aceszulfám+NA (289,5 $\pm$ 10,7) minta mutatja a legkisebb értéket a kontrollhoz képest. A xilit (294,6 $\pm$ 6,58 pg OT/mg protein) hozzáadott cukorpótló ágens és a sztívia nem éri el a kontroll értékét, viszont itt is látható a NA nélkül kezelt *in vitro* sejt kultúrához képest szignifikáns (p<0,05) változás.



9. ábra: Noradrenalin (NA) aktivált OT elválasztás vizsgálata NH kultúrákban cukorpótló vegyületek hatására (átlag $\pm$ SD, *:p<0,05, n=5)

V. Megbeszélés, következtetés

Az energianyerő mechanizmusok az alapanyagok (szénhidrátok, lipidek, nukleinsavak, proteinek) bontásából származóan kémiai energia transfereket biztosítanak (ATP, GTP, NADH₂ stb.), amelyek szükségesek az egészséges életjelenségek fenntartásához. A szabályozási rendszerek, a neuro-endokrin-immun funkciókkal ennek a nagy anyagcsereláncolat kaszkádnak a kézben tartását végzik. Vizsgálatainkat *in vivo* és *in vitro* állatkísérletes modellek segítségével, sejtszintű kutatási elrendezésben tanulmányoztuk a cukorpótló ágensek hatásait a monoamin (NA) mediált OT hormon release funkciókra.

A társadalmi aktivitásban az OT kiemelten fontos hormon, ugyanis szerepet játszik a kognitív, empatogén folyamatokban [43, 49]. A cukor homeosztázis fundamentális biztosítója a sejtek energiatermelő folyamatainak. Nem csupán az izomsejtek hasznosítják a cukor-anyagcsere folyamat termékeit, hanem az endokrin rendszer hormonelválasztásért felelős sejtjei is, így a pituiciták is. A neurohipofízis sejtek OT hormon release folyamata energia igényes folyamat [46]. Az extracelluláris térből származó inputok olyan szignál-transzdukciós mechanizmusokat regulálnak, amelyek a hormonvezikulák plazmamembránnal való asszociációjához nélkülözhetetlenek. Az energia (glükóz bontás) mellett az exocitózisban jelentős szereppel bír a Ca²⁺ is [32].

Jelen dolgozatban olyan *in vitro* modellrendszert kívántunk kidolgozni, amelyben a xenobiálisnak is tekinthető cukorpótló vegyületek tanulmányozását is meg tudtuk valósítani. A vizsgálati modellrendszer funkcióképes, ugyanis az 5. és 6. eredményábra adataiból is láthatjuk, hogy a sejt kultúrák OT release mechanizmusa kiváltható. Az alkalmazott cukorpótló vegyületek az alap hormonelválasztást csökkentően, inhibítoros jelleggel működtek (7. ábra). Ha a sejt kultúra modellrendszert *in vitro* kezeltük (cukorpótló szerekkel való előkezelést követően), akkor a gátló hatás jelentősen érvényesült a kontroll csoport értékeihez képest (8. ábra). Érdekes tapasztalat, hogy amennyiben a sejtek szabályozási kapcsolatában vizsgáljuk a hormonelválasztást, azaz a NA aktiváció függvényében, akkor a korábban inhibítoros jelleggel viselkedő cukorpótló vegyületek, már nem mutatnak ilyen egyértelmű változást. Ha megfigyeljük az eritrit és NA kezelést (9. ábra), akkor karakteresebb OT elválasztást tapasztaltunk a K-aceszulfám, xilit és sztívia csoportokhoz képest, amelyek a szabályozási körben csökkentették az OT elválasztását.

VI. Irodalomjegyzék

- [1] Das A. Social integration, self-rated health and genes? J Aging Health. 2020, 32(5-6): 462-471. doi: 10.1177/0898264319831513.
- [2] Lane MM, Gamage E, Travica N, Dissanayaka T, Ashtree DN, Gauci S, Lotfaliany M, O'Neil A, Jacka FN, Marx W. Ultraprocessed food consumption and mental health: a systematic review and meta-analysis of observational studies. Nutrients. 2022, 14(13): 2568. doi: 10.3390/nu14132568.
- [3] Yoo ES, Yu J, Sohn JW. Neuroendocrine control of appetite and metabolism. Exp Mol Med. 2021, 53(4): 505-516. doi: 10.1038/s12276-021-00597-9.
- [4] Jacques A, Chaaya N, Beecher K, Ali SA, Belmer A, Bartlett S. The impact of sugar consumption on stress driven, emotional and addictive behaviors. Neurosci Biobehav Rev. 2019, 103: 178-199. doi: 10.1016/j.neubiorev.2019.05.021.
- [5] Martin AM, Sun EW, Keating DJ. Mechanisms controlling hormone secretion in human gut and its relevance to metabolism. J Endocrinol. 2019, 244(1): R1-R15. doi: 10.1530/JOE-19-0399.
- [6] Herman MA, Birnbaum MJ. Molecular aspects of fructose metabolism and metabolic disease. Cell Metab. 2021, 33(12):2329-2354. doi: 10.1016/j.cmet.2021.09.010.
- [7] https://ellemiszerlanc.kormany.hu/download/9/15/b1000/129435_2010.pdf (letöltés dátuma 2023. 06. 05)
- [8] Lee AH, Dixit VD. Dietary regulation of immunity. Immunity. 2020, 53(3): 510-523. doi: 10.1016/j.immuni.2020.08.013.
- [9] Msomi NZ, Erukainure OL, Islam MS. Suitability of sugar alcohols as antidiabetic supplements: A review. J Food Drug Anal. 2021, 29(1): 1-14. doi: 10.38212/2224-6614.3107.
- [10] Zacharis C, Stowell J. Xylitol In O'Brien Nabors L (szerk.): Alternative sweeteners. 2011, eBook ISBN: 9780429109089, doi: <https://doi.org/10.1201/b11242>
- [11] Kandelman D. Sugar, alternative sweeteners and meal frequency in relation to caries prevention: new perspectives. Br J Nutr. 1997, 77 1: S121-8. doi: 10.1079/bjn19970109.
- [12] Ylikahri, R.: Metabolic and nutritional aspects of xylitol. Adv Food Res. 1979, 25: 159-80., doi: 10.1016/s0065-2628(08)60237-2.

- [13] Batishcheva SIu, Pozdniakov AL, Kuznetsova GG, Sheveleva SA. Vliianie éritrita na mikrofluoru kishechnika i morfologiiu vnutrennikh organov krysa [Effect of erithriol on intestinal microflora and morphology of rat internal organs]. Vopr Pitan. 2002, 71(3): 36-9.
- [14] Erian AM, Sauer M. Utilizing yeasts for the conversion of renewable feedstocks to sugar alcohols - a review. Bioresour Technol. 2022, 346: 126296. doi: 10.1016/j.biortech.2021.126296.
- [15] Park YC, Oh EJ, Jo JH, Jin YS, Seo JH. Recent advances in biological production of sugar alcohols. Curr Opin Biotechnol. 2016, 37: 105-113. doi: 10.1016/j.copbio.2015.11.006.
- [16] Liang P, Cao M, Li J, Wang Q, Dai Z. Expanding sugar alcohol industry: Microbial production of sugar alcohols and associated chemocatalytic derivatives. Biotechnol Adv. 2023, 64: 108105. doi: 10.1016/j.biotechadv.2023.108105.
- [17] Tomasskovics B., Csécsy K., Salgó A. Az eritrit – összefoglalás. Élelmiszer Tudomány Technológia, XVI. évfolyam, 29-32, 2012/4.
- [18] Arumugam B, Subramaniam A, Alagaraj P. Stevia as a natural sweetener: a review. Cardiovasc Hematol Agents Med Chem. 2020, 8(2): 94-103. doi: 10.2174/1871525718666200207105436.
- [19] Lindley, M.: Other Sweeteners. In: Mitchell H. (szerk.): Sweeteners and sugar alternatives in food technology. Blackwell Publishing, Oxford, Egyesült Királyság, pp. 231-364. (2006)
- [20] Goyal SK, Samsher, Goyal RK. Stevia (*Stevia rebaudiana*) a bio-sweetener: a review. Int J Food Sci Nutr. 2010, 61(1): 1-10. doi: 10.3109/09637480903193049.
- [21] Ádám V. (szerk.): Orvosi Biokémia - Semmelweis Kiadó, Budapest, 2016, ISBN 978-963-331-400-5
- [22] Lafrenie RM, Yamada KM. Integrin-dependent signal transduction. J Cell Biochem. 1996, 61(4): 543-53. doi: 10.1002/(sici)1097-4644(19960616)61:4<543:aid-jcb7>3.0.co;2-o.
- [23] Doyle DA, Morais Cabral J, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, MacKinnon R. The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. Science. 1998, 280(5360): 69-77. doi: 10.1126/science.280.5360.69.
- [24] Holman GD. Structure, function and regulation of mammalian glucose transporters of the SLC2 family. Pflugers Arch. 2020, 472(9): 1155-1175. doi: 10.1007/s00424-020-02411-3.

- [25] Dawkins MJ, Judah JD, Rees KR. Mechanism of oxidative phosphorylation. *Nature*. 1958, 182(4639): 875-6. doi: 10.1038/182875b0.
- [26] Hubbard SR, Till JH. Protein tyrosine kinase structure and function. *Annu Rev Biochem*. 2000, 69: 373-98. doi: 10.1146/annurev.biochem.69.1.373.
- [27] Xin P, Xu X, Deng C, Liu S, Wang Y, Zhou X, Ma H, Wei D, Sun S. The role of JAK/STAT signaling pathway and its inhibitors in diseases. *Int Immunopharmacol*. 2020, 80: 106210. doi: 10.1016/j.intimp.2020.106210.
- [28] Villarino AV, Kanno Y, O'Shea JJ. Mechanisms and consequences of Jak-STAT signaling in the immune system. *Nat Immunol*. 2017, 8(4): 374-384. doi: 10.1038/ni.3691.
- [29] Yoon TY, Munson M. SNARE complex assembly and disassembly. *Curr Biol*. 2018, 28(8): R397-R401. doi: 10.1016/j.cub.2018.01.005.
- [30] Woska JR Jr, Gillespie ME. SNARE complex-mediated degranulation in mast cells. *J Cell Mol Med*. 2012, 16(4): 649-56. doi: 10.1111/j.1582-4934.2011.01443.x.
- [31] Rizo J. Molecular mechanisms underlying neurotransmitter release. *Annu Rev Biophys*. 2022, 51: 377-408. doi: 10.1146/annurev-biophys-111821-104732.
- [32] Snyder DA, Kelly ML, Woodbury DJ. SNARE complex regulation by phosphorylation. *Cell Biochem Biophys*. 2006, 45(1): 111-23. doi: 10.1385/CBB:45:1:111.
- [33] Röder PV, Wu B, Liu Y, Han W. Pancreatic regulation of glucose homeostasis. *Exp Mol Med*. 2016, 48(3): e219. doi: 10.1038/emmm.2016.6.
- [34] Pereira S, Cline DL, Glavas MM, Covey SD, Kieffer TJ. Tissue-specific effects of leptin on glucose and lipid metabolism. *Endocr Rev*. 2021, 42(1): 1-28. doi: 10.1210/endrev/bnaa027.
- [35] Boucsein A, Kamstra K, Tups A. Central signalling cross-talk between insulin and leptin in glucose and energy homeostasis. *J Neuroendocrinol*. 2021, 33(4): e12944. doi: 10.1111/jne.12944.
- [36] Taddei ML, Pardella E, Pranzini E, Raugei G, Paoli P. Role of tyrosine phosphorylation in modulating cancer cell metabolism. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2020, 1874(2): 188442. doi: 10.1016/j.bbcan.2020.188442.
- [37] Lee J, Pilch PF. The insulin receptor: structure, function, and signaling. *Am J Physiol*. 1994, 266(2 Pt 1): C319-34. doi: 10.1152/ajpcell.1994.266.2.C319.
- [38] Choi E, Bai XC. The activation mechanism of the insulin receptor: a structural perspective. *Annu Rev Biochem*. 2023, 92: 247-272. doi: 10.1146/annurev-biochem-052521-033250.

- [39] Donato J Jr, Frazão R, Elias CF. The PI3K signaling pathway mediates the biological effects of leptin. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2010, 54(7): 591-602. doi: 10.1590/s0004-27302010000700002.
- [40] Sharma A, Mehan S. Targeting PI3K-AKT/mTOR signaling in the prevention of autism. *Neurochem Int.* 2021, 147: 105067. doi: 10.1016/j.neuint.2021.105067.
- [41] Hoffer LJ. Cori cycle contribution to plasma glucose appearance in man. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 1990, 14(6): 646-8. doi: 10.1177/0148607190014006646.
- [42] Gimpl G, Fahrenholz F. The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. *Physiol Rev.* 2001, 81(2): 629-83. doi: 10.1152/physrev.2001.81.2.629.
- [43] Amico JA, Mantella RC, Vollmer RR, Li X. Anxiety and stress responses in female oxytocin deficient mice. *J Neuroendocrinol.* 2004, 16(4): 319-24. doi: 10.1111/j.0953-8194.2004.01161.x.
- [44] Andari E, Duhamel JR, Zalla T, Herbrecht E, Leboyer M, Sirigu A. Promoting social behavior with oxytocin in high-functioning autism spectrum disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010, 107(9): 4389-94. doi: 10.1073/pnas.0910249107.
- [45] Jones C, Barrera I, Brothers S, Ring R, Wahlestedt C. Oxytocin and social functioning. *Dialogues Clin Neurosci.* 2017, 19(2): 193-201. doi: 10.31887/DCNS.2017.19.2/cjones.
- [46] Marsh N, Marsh AA, Lee MR, Hurlemann R. Oxytocin and the neurobiology of prosocial behavior. *Neuroscientist.* 2021, 27(6):604-619. doi: 10.1177/1073858420960111.
- [47] Gutkowska J, Jankowski M, Antunes-Rodrigues J. The role of oxytocin in cardiovascular regulation. *Braz J Med Biol Res.* 2014, 47(3): 206-14. doi: 10.1590/1414-431X20133309.
- [48] Bealer SL, Armstrong WE, Crowley WR. Oxytocin release in magnocellular nuclei: neurochemical mediators and functional significance during gestation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2010, 299(2): 452-8. doi: 10.1152/ajpregu.00217.2010.
- [49] Froemke RC, Young LJ. Oxytocin, neural plasticity, and social behavior. *Annu Rev Neurosci.* 2021, 44: 359-381. doi: 10.1146/annurev-neuro-102320-102847.

VII. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Molnár Zsolt Tanár Úrnak, Dr. habil. Radács Marianna Tanárnőnek, akik kitartó munkájukkal és tudásukkal segítették az OTDK dolgozatom elkészülését. Továbbá köszönöm a JGYPK, AEKNI, Környezet-biológia és Környezeti Nevelés Tanszék, Környezet-toxikológiai Kutatóműhely munkatársainak a támogatását, segítségét!

Végül köszönetet szeretnék mondani szüleimnek és testvéreimnek, akik biztatásával nem jöhetett volna létre jelen munkám.

**A 37. OTDK
BIOLÓGIA SZEKCIÓ FELHÍVÁSÁNAK
2. SZÁMÚ MELLÉKLETE**

TÉTELES SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁS

Alulírott **Kiss Péter Sándor** nyilatkozom, hogy a 37. OTDK-ra benyújtott ***In vitro* neuroendokrin modell a cukorpótló vegyületek hatásainak vizsgálatára** című pályamunkámban leírtak esetében az alábbi munkafolyamatok elvégzésében vettem részt¹:

Részfeladat ²	A részvétel mértéke (öt fokozatú skálán [#] jellemezve)
A hím Wistar patkányok fenntartása, gondozása a dolgozat Módszerek fejezetében bemutatott etikai engedély alapján	3
A kísérleti végpontokban neurohipofízis sejt kultúrák készítése, a Módszerek fejezetben meghatározott módon, a sejt kultúrák fenntartása, viabilitás kontrollja, cukorpótló ágensek oldatainak elkészítése, <i>in vitro</i> sejt kultúra kezelések, a steril eszközök biztosítása	4
Steril oldatok, tápoldatok készítése, steril eszközök előkészítése, steril fülke előkészítése	5
A felülúszó médiumból mintavétel, majd az oxitocin meghatározás ELISA módszerrel	3
Az adatok statisztikai feldolgozása	2
A mérésekből származó adatok rendszerezése, ábrák készítése	4
Szakirodalmi feltárás	4

Kelt: Szeged, 2024. 05. 01.

(Kérjük a dőlttel jelölt részeket értelemszerűen cseréljék, módosítsák).



Pályamunkát benyújtó hallgató (Kiss Péter Sándor)

aláírása

A nyilatkozatban foglaltak helyességét megerősítem:



Témavezető (Dr. Molnár Zsolt, SZTE JGYPK, AEKNI, Környezet-biológia és Környezeti Nevelés

Tanszék)

aláírása



¹ A kutatási projekt azon részfadatait, amelyekben egyáltalán nem vett részt, ne tüntesse fel a listában.

² Az alábbi lista mintául szolgál, szabadon módosítható, bővíthető.

#Magyarázat:

A munkafolyamatokban való részvétel mértékét ötfokozatú skálán kérjük értékelni. A skála egyes értékeinek jelentése:

5 – Felkészítés után a feladat teljes egészét önállóan végeztem a pályamunkához szükséges mennyiségben.

4 – Felkészítés után a feladat több mint felét önállóan végeztem a pályamunkához szükséges mennyiségben.

3 – Felkészítés után a részfeladat felét önállóan végeztem a pályamunkához szükséges mennyiségben.

2 – Felkészítés után a részfeladat kevesebb mint felét önállóan végeztem a pályamunkához szükséges mennyiségben.

1 – A részfeladatot folyamatos segítséggel végeztem a pályamunkához szükséges mennyiségben.

Melnor Zolt

