

Állatorvostudományi Egyetem
Aujeszky Aladár Elméleti Állatorvostudományok Doktori Iskola
Budapest

Témavezetők:

.....
Dr. Frenyó V. László, CSc
Élettani és Biokémiai Tanszék
Állatorvostudományi Egyetem

.....
Dr. Zsarnovszky Attila, PhD
Állatélettani és Állat-egészségtani Tanszék
Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar, Szent István Egyetem

Készült 8 példányban. Ez a(z) számú példány.

.....
Gergely Jócsák

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	3
2. A kutatás jelentősége és a kitűzött célok	5
3. Anyag és módszer	6
4. Eredmények megbeszélése	7
5. Összefoglalás	12
6. Új tudományos eredmények	13
7. Publikációk	14

1. Bevezetés

A környezeti endokrin diszruptor (ED) kifejezés azon vegyületek jellemzésénél használatos, amelyek – akár igen kis dózisban is – képesek befolyásolni az emlős hormonrendszer élettani szabályozását, így károsítva a szervezet neuroendokrin funkcióit. A hormonrendszer egyensúlyának felborulása az ún. „feed-back” mechanizmusok, és a sejten belüli jelátviteli folyamatok károsodásának következménye, amely ezen testidegen vegyületek hatásának köszönhető.

Az ED-ok szinte mindenhol megtalálhatóak. Az állati és az emberi szervezet folyamatosan több, különböző forrásból származó ED hatásának van kitéve. Ezen vegyületek legtöbbször különböző módokon képes a szervezet védőrétegein átjutni. Orális úton a tápcsatornában felszívódva, esetleg a bőrön keresztül direkt – sebeket keresztül indirekt – módon bekerülve a szövetekbe, illetve nyálkahártyákon (szem-, orrüreg-, száj-, és légutak nyálkahártyáján) keresztül is bejuthat a szervezetbe. Egyes ED hatású vegyületek képesek más vegyületek felszívódását megkönnyíteni, esetleg az élőlény immunrendszerét legyengíteni, mindezzel a diszruptor hatást erősíteni.

Ha az élőlény neuroendokrin szabályozása zavart szenved, az egyedszinten súlyos fejlődéstani, és élettani elváltozásokat is okoz. A felszívódott vegyület a szervezet legkülönbözőbb pontjait károsíthatja. Az ED-ok hatással vannak a vér alakos elemeinek alakulására, jelenlétük esetén a keringő immunsejtek száma és hatékonysága lecsökken; a vese és a máj detoxifikáló hatása sérül; a homeosztázist szabályozó hormonális rendszer jelátviteli útvonalai és a központi idegrendszer működése is zavart szenved. Az állatok szaporító szervrendszereinek károsítása következtében állattenyésztési problémákat, és így jelentős – a gazdaságra nézve káros - hatást is képesek ezek az anyagok előidézni.

Az alábbi doktori dolgozat alapjául szolgáló kísérletek során négy jól ismert és széleskörűen elterjedt ED hatását vizsgáltunk meg. A biszfenol-A (BPA) műanyagok ipari előállításakor keletkezik mint melléktermék; A zearalenon (ZEA) egy az állati takarmány gombafertőzése következtében termelődő mikotoxin ismert káros szaporodásbiológiai hatással; az arzén (As) egy a talaj- és ivóvizekben előforduló metalloid vegyület erős citotoxikus és hormonrendszert károsító hatással. A kámfort (MBC) távol-keleti kultúrában fűszerként, illetve illatanyagként használják, emellett a kozmetikai és gyógyszeriparban is széleskörűen alkalmazzák.

A pajzsmirigy hormonok (TH) aktív formájaként ismert trijód-tironin (T3), és a pajzsmirigyben a T3 prohormonjaként szintetizálódó tiroxin (T4) elsődlegesen egy a szöveti metabolizmust serkentő funkcióval rendelkeznek. Elválasztásuk a neuroendokrin rendszer részeként működő hipotalamusz-hipofízis-pajzsmirigy tengely (HPT) szabályozása alá esik. A HPT tengely visszacsatolásos T3 és T4 szintet szabályozó működését a környezeti ED-ok igen sok ponton

képesek befolyásolni, így súlyos fejlődéstani és élettani problémáknak lehetnek előidézői akár a központi idegrendszerben is.

Az ösztrogének – ösztron (E1), ösztradiol (E2) és ösztriol (E3) – az állatok reprodukív folyamatait szabályozó szteroidhormonok. Ezen hormonok felelnek a női szaporítószervek megfelelő fejlődéséért, és a női nemi ciklus kialakításáért is, valamint a hímegekben is fontos szabályozó szereppel rendelkeznek. Hasonlóképp a HPT szabályozási mechanizmusaihoz, az E2 szintjét is a neuroendokrin rendszer állítja be a hipotalamusz-hipofízis-gonád (HPG) tengely segítségével. Az ösztrogének minden egyes emlős sejt fejlődésének szabályozásában fontos szereppel rendelkeznek. Ha a HPG tengely kényes szabályozó hatása felborul, az daganatok képződésével járhat az elsődleges és másodlagos reprodukív szervekben (pl. mellrák, prosztaták). Az ösztrogének emellett a központi idegrendszer fejlődésének és működésének is fontos regulátorai. A kóros ösztrogén szintet az irodalomban összekapcsolják a magasabbrendű kognitív folyamatok sérülésével, a szinapszisok működésének károsodásával és ezek következtében kialakuló másodlagos viselkedésbeli és pszichológiai problémák kialakulásával.

Az E2 és THk hatása főként ezen hormonok saját magreceptoraihoz – az ösztrogén receptorokhoz (ER) és pajzsmirigy hormonreceptorokhoz (TR) – kötődve nyilvánul meg. Ezen receptorok a sejt belsejében található, ligand-modulálta transzkripciós faktorokként működnek. Aktivációjukat a megfelelő célgének (ERt és TRt kódoló DNS szakaszok) transzkripciója követi. Az ED-ok hormonrendszert károsító tulajdonságának oka a vizsgált vegyületek ezen magreceptorok aktiváló képességében keresendő. Tekintve hogy az E2 és a pajzsmirigy hormonok ön- és egymás receptorainak átíródására is hatással vannak, és az idegsejtek fejlődését és élettanát is szabályozzák, a rendszer sérülése (az ED-ok hatására) elsődlegesen a neuroendokrin hormonok és receptoraik szintjén nyilvánul meg. Ezt követően az organizmus fejlődése (aktivációs hatás) és élettana (modifikációs hatás) is zavart szenvedhet.

A különböző környezeti endokrin diszruptor anyagok hatása a központi idegrendszerre önmagukban, és kombinációjukban sem ismert. Hiányoznak az irodalomban elérhető publikációk a különböző ED-ok intracelluláris jelátvitelre gyakorolt hatásáról, illetve a vegyületek adott receptor agonista/antagonista karakterének azonosítása sem történt még meg. Figyelembevétel e vegyület típus magas környezeti előfordulását, felmerül az igény egy – az ED-ok hatását önmagukban és kombinációjukban – vizsgáló kísérletsorozat végrehajtására. Ennek eredményeként fény derülhet e káros anyagok esetleges kumulatív élettani hatására.

2. A kutatás jelentősége és a kitűzött célok

Az emberi és állati szervezet igen gyakran kapcsolatba kerül endokrin diszruptorokkal. Az ED-ok szinte bárhol megtalálhatóak környezetünkben, és az inkorporációt követően feltételezhetően felerősítik egymás hatását (esetlegesen legyengítik az egyed immunrendszerét). A neuroendokrin szignalizációs útvonalak bonyolultságának következtében az ED-ok pontos hatásmechanizmusa nem ismert. Az adott szervek (hipotalamusz, hipofízis, pajzsmirigy, gonádok) működése és a termelt hormonok szintézisének, szállításának, és lebontásának megzavarása mellett az ED-ok főleg a hormon-receptor kapcsolatrendszeret zavarják meg.

Az ED-ok okozta zavar a hormonális jelátvitelben annak köszönhető, hogy ezen vegyületek képesek megkötődni az ösztrogén ($ER\alpha$ és $ER\beta$) és a pajzsmirigy hormonreceptorokon ($TR\alpha$ és $TR\beta$). Agonista vagy antagonistá módon befolyásolva a receptorok működését az intracelluláris jelátviteli útvonalak és a visszacsatoló szabályozás zavart szenved. Az elérhető irodalom és kutatócsoportunk már publikált eredményei is feltételezik, hogy az ED-ok önmagukban és kombinációban az ösztrogén és pajzsmirigyhormonok közti egyensúly megzavarásával a fejlődésben lévő idegrendszert maradandóan károsíthatják.

A kísérletünk célja annak bizonyítása miszerint **a különböző környezeti endokrin diszruptorok hatása káros az idegsejtek fejlődésére nézve, és ez a hatás additív – összeadódik.** A hipotézis igazolására a biszphenol-A (BPA), zearalenon (ZEA), arzén (As) és 4-metilbenzilidén kámfor (MBC), négy széleskörűen elterjedt és ismert ED hatását vizsgáltuk meg önállóan, majd a kombinált hatásukat is teszteltük. A vizsgálatunk céljai a következők voltak:

A. A négy ED (BPA, ZEA, As, MBC) hatásának vizsgálata önmagukban és kombinációban a $TR\alpha$, $TR\beta$ és $ER\beta$ receptorok mRNS és fehérjeexpressziós szintjére idegsejtekben.

B. A $TR\alpha$, $TR\beta$ és $ER\beta$ receptorok transzkripciójában és translációjában bekövetkező, ED hatások kiváltotta különbségek kimutatása az ösztrogén és/vagy pajzsmirigy hormon hiányában és jelenlétében.

C. Az idegszövetet alkotó, az idegsejtekkel szoros kapcsolatban lévő gliasejtek hiányában fellépő változások detektálása a $TR\alpha$, $TR\beta$ és $ER\beta$ receptorok expressziójában mRNS és fehérjeszinten az ED kezelés hatására.

3. Anyag és módszer

A hipotézisünk igazolásához patkány primer kisagyi szemcsesejtkultúrát használtunk. Az idegsejtekben megtalálhatóak az ösztrogén- és pajzsmirigy hormon receptorok, a gliasejtek jelenléte szabályozható a rendszerben, a sejtkultúra nagy mennyiségben előállítható és a kísérleti körülmények igényeinknek megfelelően kontrollálhatók.

A sejtkultúra előállításához 7 napos hím és nőstény Wistar patkányokat használtunk. A vemhes nőstények az ellés várható ideje előtt minimum négy nappal érkeztek meg a beszállítótól. Az állatokat megfelelő körülmények között *ad libitum* etetés és itatás mellett 12-12 órás sötét-világos ciklusban tartottuk. A rokonsági kapcsolatokat figyelemmel kísértük, egyazon alom állatait különböző kezelési csoportokba osztottuk be. Kísérleteinket a Szent István Egyetem állatjóléti bizottsága és a regionális állatvédelmi hatóság engedélyezte (az állatvédelmi engedély száma: XIV-I-001/2201-4/2012).

A kisagyat a 7. posztnatális napon távolítottuk el. A szövetet enzimátikus kezelés nélkül szérum és szteroidmentes médiumban szuszpendáltuk. Az inkubáció első napján (a kiültetést követő 24. órában) a minták fele arabinofuranozid-citidin (AraC) kezelést kapott, a glia szaporodásának megakadályozása céljából (Glia- csoportok). A minták másik fele kezeletlen maradt (Glia+ csoportok). A 7 napos inkubációs időt követően a sejtek az átlagos környezeti szennyezőértéknek megfelelő koncentrációjú ED (BPA, ZEA, As, MBC vagy ezek kombinációja) kezelést kaptak. A minták egy része E2 és/vagy T3 és/vagy T4 kezeléssel esett át.

Az ER és TR receptorok mRNS expressziójának detektálására a sejteket 6 órával a kezelés után takarítottuk be, majd kvantitatív real-time PCR módszert alkalmaztunk. A fehérjeszintet 18 órával a kezeléseket követően Western blot módszerrel detektáltuk.

Az eredményeket mindkét esetben a kezeletlen kontroll (ntC) mintákhoz normalizáltuk. A kontroll értékét önkényesen 1-nek vettük, eredményeinkben a további kísérleti csoportokból mért értékeket az ntC értékhez mért arányukban ábrázoltuk. A statisztikai analízis céljából egy- és kétutas ANOVA módszert és Tukey post hoc elemzést használtunk, majd az eredményeinket az EXCEL és a GraphPad Prism (4.0) segítségével értékeltük ki.

4. Eredmények megbeszélése

Biszfenol-A

A glia jelenlététől független módon, a glia tartalmú és a gliacsökkentett mintákban egyaránt hasonló módon változtatta meg a BPA a vizsgált receptorok mRNS expresszióját. A kezeletlen kontrollhoz képest a BPA önmagában erőteljesen lecsökkentette a génexpressziót. Fontos leszögezni, hogy a jelen kísérlet bizonyos mintáiban „előállított” E2 és T3 deprivált környezet igen messze áll az élettani állapotoktól, de a BPA jelátviteli útvonalakra gyakorolt hatásairól összetettebb képet kaphatunk ezen minták eredményeinek vizsgálatával. A vizsgált hormonok mellett adagolva az ED minden kezelési párban (azonos hormonok mellett ED kezelt és ED kezeletlen csoportok összehasonlításakor) megnövelte a génexpressziót. Az irodalomban elérhető adatok hiányának következtében csak hipotéziseink lehetnek az erőteljes transzkripciót megnövelő hatás okára. A BPA feltételezhetően indirekt módon hat a génexpresszió változására, az ED által aktivált receptorok csak felerősítik a hatását.

A transzláció szintjén a BPA hatása minden kezelési csoportban gyengébbnek bizonyult, mint amit a transzkripciós szinteken mértünk, azonban az ED kezeletlen mintákhoz képest így is erőteljes serkentő hatást figyeltünk meg minden BPA kezelt csoportban, így a transzkripciós szinten ellentétes hatást mutató „csak BPA” kezelt csoportban is. Ezen eredmények – a transzkripció és transzláció között tapasztalt különbségek – alapján feltételezhető, hogy az mRNS és fehérjeexpressziós folyamatok között bizonyos reguláló mechanizmusokra (pl. mikroRNS szabályozás) is igen erős hatása van a BPA-nak.

Fehérjeszinten a gliasejtek a BPA-hatását csak a TR α receptor expresszió esetében modulálták. Az eredményeink kimutatták, hogy a TR β és ER β receptorok expressziója erőteljesen módosul a BPA hatására a glia jelenlétében is, azonban *in vitro* – feltételezhetően *in vivo* – környezetben a gliasejtek szabályozni képesek a BPA TR α receptorexpresszióra gyakorolt hatását. A gliasejtek hiányában minden ED kezelt csoportban megnőtt a fehérjeexpresszió. A kísérleteink fényében kijelenthető, hogy a BPA az idegsejteken endokrin diszruptorként viselkedik.

Zearalenon

A ZEA a BPAhoz hasonló módon minden ED kezeletlen csoporthoz képest megnövelte a receptor mRNS expresszióját a ZEA kezelt párokban. A gliasejtek moduláló hatására transzkripciós szinten nem találtunk bizonyítékot. A kísérletekben használt ED-ok közül a ZEA volt az egyetlen, amely minden kezelési csoportban legátolta a receptorexpressziót. Jelen

mikotoxinról ismert hogy agonista és antagonistán módon is képesek bizonyos receptorokat (pl. az ER α és ER β receptort) befolyásolni, azonban a jelátviteli utakra gyakorolt pontos hatásuk még nem ismert. Ennek fényében eredményünk különösen fontos lehet, hiszen az intracelluláris jelátvitel végpontjában (a transzkripcióban) mindenhol gátló hatást tapasztaltunk.

Ez a gátló hatás a transláció szintjén eltűnik, a ZEA hatásának iránya megfordul. Fehérjeszinten a ZEA minden ED kezelt csoportban (az ED kezeletlen párokhoz képest) megnövelte mindhárom vizsgált receptor expressziós szintjét. A gliasejtek protektív hatására csak a TR α receptor expressziójának szintjén találtunk bizonyítékot. A gliacsökkentett mintákban minden esetben megnőtt a fehérjeexpresszió, ezzel ellentétben a glia tartalmú mintákban ez a hatás csak akkor volt detektálható ha a pajzsmirigyhormonok hiányoztak a sejtek környezetéből. Az eredményeinkből feltételezhető, hogy a T3 és T4 egyfajta védekező hatással bír az idegsejteken abban az esetben ha a glia moduláló hatása kiesik. A TR β és ER β esetén nem találtunk hasonló különbséget. A mért ZEA hatások alapján kijelenthető hogy a gombatoxin is endokrin diszruptor hatással rendelkezik az idegszöveten.

Arzén

Arzén kezelés után mRNS szinten mindhárom vizsgált receptor esetén detektálható volt a glia moduláló hatása. Azokban a csoportokban amelyekben a szemcsesejtek gliasejtek jelenlétében kapták az EDT, az arzén kezelt és kezeletlen minták között nem találtunk különbséget. A gliacsökkentett sejt kultúrákban azonban az arzénkezelt mintákban erőteljesen lecsökkent az mRNS expresszió az As kezeletlen mintákhoz képest.

A transláció szintjén is megfigyelhető volt az arzén erős receptorexpresszióra gyakorolt gátló hatása. Az ER β receptor esetében gliát tartalmazó minták eredménye minden esetben korrelált a kezelési csoportoknak megfelelő mintákból mért transzkripciós hatásokkal. A TR α és TR β receptor esetén az eredmények nagyfokú varianciát mutattak, de az arzén gátló hatása ezekben a csoportokban is mérhető volt. A gliacsökkentett minták fehérje expressziója a transzkripcióhoz hasonló mintázatot mutatott, az ED gátló hatásának mértéke kismértékben lecsökkent a transláció szintjén, de így is sokkal potensebbnek bizonyult, mint glia jelenlétében. A gliasejtek feltételezhetően lecsökkentik az arzén ismert apoptotikus hatását az idegsejteken, így csak az ER β receptor expressziója módosult, ezzel bizonyítva az arzén endokrin diszruptor tulajdonságát.

4-metilbenzilidén kámfor

A vizsgált endokrin diszruptorok közül a kámfor ER β receptor mRNS transzkripcióra gyakorolt moduláló hatása volt a legnagyobb. A vegyület glia jelenlétében a pajzsmirigy hormon receptorok expressziós szintjét is megnövelte, azonban ez az erőteljes serkentő hatás a gliamentes mintákban nem volt detektálható. A gliasejtek hiányában az MBC erőteljes gátló hatással bírt a TR α és TR β receptorok mRNS expressziós szintjére.

Az irodalomban elérhető adatok alapján a kámfor hatása főként a pajzsmirigyhormonok intracelluláris jelátvitelén érvényesül. Ezt a hatást detektáltuk fehérjeszinten is, a T3 és T4 kezelt kísérleti csoportokon az MBC igen potens a receptor fehérje expresszióját serkentő hatást tudott kiváltani. Gliasejtek jelenlétében ez a serkentő hatás alacsonyabb volt. Ez a jelenség TR α és ER β receptor esetében kialakított kísérleti csoportokban volt megfigyelhető, a TR β receptor esetében a kámfornak nem volt hatása. Gliasejtek hiányában ez a hatás mindhárom receptoron megfigyelhető volt.

Összességében a kámfor ED hatásáról kijelenthető, hogy a BPA, ZEA és Arzéntól eltérő módon hat, a hatást a gliasejtek és a pajzsmirigy hormonok jelenléte erőteljesen befolyásolja, és ez az ED hatás mérhető az idegsejteken.

A kombinált ED kezelés hatása

Az ED-ok kombinált hatására bekövetkező legjelentősebb változásokat a glia tartalmú mintákban találtuk, ösztrogén és trijód-tironin hiányában. A TR α , TR β és ER β receptorok **mRNS szintje** a többi kezelési csoportban is megnőtt a kombinált kezelés hatására, a glia csökkentett csoportokban is. Transzkripció szinten a legtöbb minta értékei igen magas variációt mutattak. A különböző ED-ok más-és-más pontokon befolyásolták a sejten található intracelluláris útvonalakat, egyes receptorokon agonista, más receptorokon antagonistán módon hatva, és ezen folyamatok összessége a különböző mintákban erőteljesen változó eredményt hozott. Az E2 és T3 hiányában tapasztalható erőteljes kombinált ED hatás a gliasejtek jelenlétében is detektálható volt. Ez az eredmény különösen fontos annak fényében, hogy az egyedfejlődés során a neuroendokrin hormonok szintje erőteljesen változik, így a fiatal szervezeten az ED-ok hatása sokkal potensebb lehet, mint a már kifejlődött egyedeken történő modifikációs hatás.

Az eredményeink alapján kimondható, hogy a vizsgált receptorok transzlációs szintjén az adott receptorok expressziójának változásáért más-és-más ED-ok lehetnek felelősek. A **TR α receptor fehérje** expressziójára az MBC hatása bizonyult a legerősebbnek. A kombinált kezelés hatása ezen a receptoron az MBC hatásával szinte megegyezett, a serkentő hatás a

BPA, ZEA és As hatásánál erőteljesebbnek bizonyult. Feltételezhetően a kámfor hatás olyan potens, ami „eltakarja” a mellette adott további endokrin diszruptorok hatását.

A **TR β receptor** expressziója erőteljes hasonlóságot mutatott az As és MBC kezeléshez, ezekben a kezelésekben az ED okozta receptorexpresszió nem mutatott eltérést az ED kezeletlen mintákból mért értékekhez képest. Tekintve hogy a BPA és a ZEA önmagában megnövelte a fehérjeexpressziót, szinte bizonyosan kijelenthető hogy a kombinált kezelés során ezen diszruptorok hatása nem érvényesült. Lehetséges hogy a BPA és a ZEA intracellulárisan egymásnak ellentétes hatásmechanizmussal rendelkeznek, így kombinálva kioltják egymás moduláló képességét. Esetleg az As és MBC olyan erősen módosíthatja ezen útvonalakat, amely – a TR α receptor esetéhez hasonlóan – „eltakarja” a BPA és a ZEA hatását. Ezen eredmény ismeretében kijelenthető, hogy a kombinált ED kezelés hatása nem feltétlenül additív.

Bizonyos ED-ok az **ER β receptor** fehérje expresszió esetén is erőteljes eltérést mutatnak a kombinált kezelés hatására. Az „ED koktél” minden mintában nagyjából 2.5-szeres növekedést okozott az ED kezeletlen mintákhoz képest. Ilyen mértékű eltéréseket a BPA és a ZEA kezelések alkalmával tapasztaltunk, az ER β receptor expresszióját az As nem emelte meg, a kámfor azonban meghatszorosozta. Ennek következtében feltételezhető a BPA és a ZEA dominanciája az ER β receptor expresszióján. Jelen eredmény többféle módon is megjelenhet a sejtekben a transzláció szintjén: 1.) A négy ED hatása „kiátlagolódhat”. Lehetséges hogy az arzén lecsökkentette fehérjeexpresszió és a kámfor serkentette változások bizonyos jelátviteli útvonalak szintjén kiegyenlítődnek. 2.) Az ER β receptor esetében a BPA és a ZEA rendelkezhet a kámfort és az arzént „eltakaró” hatással. 3.) Elméletileg lehetséges a sejtek energiaháztartásának kimerülése az ED-ok hatására, az erőteljes transzkripció és transzláció ugyanis igen energiaigényes. Ennek következtében csak egy megadott szintig növekedhet a fehérjeexpresszió mértéke, így az a BPA és a ZEA hatásának szintjén megállt. Ennek az elméletnek azonban ellentmond az önálló MBC kezelés hatására kialakuló robusztus fehérje expressziós szint.

Az eredményekről összességükben elmondható, hogy a vizsgált ED-ok minden esetben befolyásolták egyes receptorok mRNS és/vagy fehérjeexpresszióját. Mindegyik vegyület rendelkezett endokrin diszruptor hatással az idegsejteken. A gliatartalmú és gliacsökkentett minták között tapasztalt különbségek feltételezik bizonyos – a transzkripció előtt, és a transzkripció és transzláció között található – reguláló folyamatok meglétét, illetve az ED-ok képességét ezen folyamatok hatásának modulálására. A gliasejtek dejodináz aktivitása (a T4 hormon aktív T3 formába történő konverziója) mellett feltételezhetően egyéb folyamatok, például a microRNS szabályozás, esetleg a sejtek energiaháztartásának változása a mitokondriumok biokémiájának szabályozásán keresztül is hatással lehet a végső

fehérjeexpressziós szint kialakulására. Erre bizonyíték az mRNS és fehérjeszint változások között tapasztalható két-, egyes esetekben három nagyságrendbeli eltérés az ED kezelések hatására.

Mindenesetre az eredmények alapján látható az ED-ok azon hatása, amely képes a fejlődésben lévő, és a már kifejlett idegsejtek élettanát módosítani, ami jelenleg még ismeretlen káros – esetlegesen pozitív – biológiai következményekkel járhat az egyed idegrendszerére nézve, így fontos ezen vegyületek hatásának további vizsgálata.

5. Összefoglalás

A jelen doktori dolgozat eredményei bebizonyítják, hogy az alkalmazott környezeti endokrin diszruptor vegyületek (biszfenol-A, zearalenon, arzén és kámfor) – önállóan és kombinációban – képesek befolyásolni az emlős hormonrendszert a TR α , TR β és ER β receptor mRNS és fehérje expressziójának megváltoztatásán keresztül. A gliatartalmú és gliacsökkentett minták, és a transzkripció és transláció között tapasztalható különbségek feltételezik több – az ED-ok által befolyásolható – folyamat jelenlétét az intracelluláris jelátvitel és a receptorexpresszió folyamán. A beavatkozás pontja és mechanizmusa ED függő, elméletileg a receptoraktiváció és a transláció között minden egyes biokémiai változás befolyásolható a különböző endokrin diszruptor vegyületek által. Az ED-ok agonistaként és antagonistaként is beavatkoznak a rendszer bizonyos pontjain. Ezen eredmények részben ellentmondanak a vártnak, minthogy a kísérletek előtt feltételeztük hogy a különböző ED-ok nagyjából hasonlóképpen fognak hatni a vizsgált receptorokra, hiszen ugyanazokat a jelátviteli útvonalakat képesek befolyásolni.

Az eredmények alapján kijelenthető, hogy: 1.) a vizsgált ED-ok TR α , TR β és ER β transzkripciót és translációt befolyásoló hatásának módja különbözik, az adott endokrin diszruptorra jellemző módon megy végbe. 2.) Az ösztrogén és pajzsmirigy hormonok befolyásolják az ED-ok hatását. Hiányuk esetén az ED-ok moduláló hatása erősebbnek bizonyult. 3.) A gliasejtek *in vivo* módosították a vizsgált receptorok expressziós szintjeinek változását az ED-ok hatására. Feltételezhetően ez a hatás az idegsejteken *in vitro* rendszerekben is érvényesül.

Ezen környezeti endokrin diszruptor vegyületek önmagukban és kombinációban is képesek a neuroendokrin rendszer befolyásolására. Ha az ideg- és gliasejtek az egyedfejlődés alatt zavart szenvednek, annak jelenleg még nem ismert – káros, esetleg előnyös – következményei lehetnek, az organizmus központi idegrendszere és hormonrendszere akár maradandó károkat is szenvedhet. Így érdemes elkerülni az ED-ok inkorporációjának lehetőségét, és fontos a társadalom figyelmét felhívni az ED-ok közvetítette veszélyekre is.

6. Új tudományos eredmények

A/1. A TR α , TR β és ER β mRNS és fehérje expressziós szintjére a biszfenol-A (BPA), zearalenon (ZEA), arzén (As) és a 4-metilbenzilidén-kámfor (MBC) önmagában és kombinációban is erőteljes hatással volt.

A kezeletlen kontrollhoz képest a **receptorok mRNS szintjét** a BPA erőteljesen megemelte, a ZEA megfelezte a transzkripció szintjét. Az As gátló hatása a gliasejtek hiányában tudott érvényesülni. Az MBC hatása a kezelés hormontartalmától függött.

A **receptor fehérjeszinteket** a BPA és a ZEA a TR β és ER β esetén megkétszerezte (a TR α szintje a gliasejtek hiányában emelkedett csak meg). Glia jelenlétében az As csak az ER β receptor expressziójára volt hatással, míg glia hiányában mindhárom receptor expressziója lecsökkent. Az MBC a TR α és ER β szintjét emelte meg, a TR β receptor expressziójára nem volt hatással a glatartalmú mintákban.

A/2. A különböző ED-ok kombinált hatása receptorfüggést mutatott, a hatás erőssége nem volt additív. Transzkripció szinten a mért adatok szintje nagyfokú eltéréseket mutatott. A transláció szintjén az ED hatásokban a TR α receptor esetén az MBC, a TR β receptor esetén az MBC és az As, az ER β receptor esetén pedig a BPA és a ZEA dominált.

B/1. Az ösztradiol (E2), a trijódttironin (T3) és a tiroxin (T4) is receptor specifikus és ED függő módon módosította a különböző EDk (BPA, ZEA, As és MBC) hatását. A T3 lecsökkentette a BPA TR α , TR β és ER β receptor mRNS szintekre gyakorolt hatását. Az As hatása hormonfüggetlennek bizonyult, a T3 csökkentette az MBC hatását a fehérjeexpressziós szinteken.

B/2. A BPA, ZEA, As és MBC között létrejövő interakció hatása a T3 és E2 alacsony szintje mellett erőteljesnek bizonyult.

C. A gliasejtek jelenléte in vitro lecsökkentette a különböző ED-ok hatását az idegsejteken. Glia hiányában az endokrin diszruptorok moduláló hatása sokkalta erőteljesebbnek bizonyult.

7. Publikációk

A disszertáció alapjául szolgáló tudományos közlemények

Impact factorral rendelkező tudományos folyóiratokban megjelent cikkek

Jocsak G., Kiss DS., Toth I., Goszleth G., Bartha T., Frenyo LV., Horvath TL., Zsarnovszky A.: **Comparison of Individual and Combined Effects of Four Endocrine Disruptors on Estrogen Receptor Beta Transcription in Cerebellar Cell Culture: The Modulatory Role of Estradiol and Triiodo-Thyronine**, *Int J Environ Res Public Health*, 13(6). pii: E619. doi: 10.3390/ijerph13060619., 2016. (IF: 2.035)

Somogyi V., Horvath TL., Toth I., Bartha T., Frenyo VL., Kiss DS., **Jocsak G.**, Kerti A., Naftolin F., Zsarnovszky A.: **Influence of bisphenol A on thyroid hormone receptors in rat cerebellar cell culture**, *Acta Vet Hung*, 64(4):497-513, 2016. (IF: 0.871)

Jocsak G., Kiss DS., Toth I., Barany Z., Zsarnovszky A., Frenyo VL.: **A zearalenon, mint mikotoxin káros hatásai az emlős szervezetben: az utóbbi évtizedek eredményeinek rövid áttekintése. (Adverse biological effects of the mycotoxin zearalenone in mammals: a review.)**, *Magyar Állatorvosok Lapja*, 139(1):55-63, 2017. (IF: 0.185)

Nemzetközi konferencia kiadványokban megjelent összefoglalók

Toth I., Kiss DS., **Jocsak G.**, Bartha T., Frenyo VL., Zsarnovszky A.: **Effects of Bisphenol A on the regulation of estrogen- and thyroid hormone receptor expression in presence of estrogen and/or thyroid hormones on the developing cerebellum**, P142, In: *International Brain Research Organization International Workshop*, Debrecen, Hungary, 2014. **Jocsak G.**, Toth I., Somogyi V., Bartha T., Frenyo VL., Zsarnovszky A. : **Effects of bisphenol a on the expression level of er and th receptors in the developing cerebellum**, FENS-0461, In: *9th Meeting of Federation of European Neuroscience Societies*, Milano, Italy, 2014.

Jocsak G., Somogyi V., Toth I., Goszleth G., Bartha T., Zsarnovszky A.: **Endocrine disruptor effect of Bisphenol A on the developing cerebellum, through estrogen and thyroid hormone receptor expression level changes**, p9.2, In: *Meeting of Hungarian Physiological Society - Federation of European Physiological Societies*, Budapest, Hungary, 2014; *Acta Phys.* 211. 148, 2014.

Jocsak G., Toth I., Somogyi V., Kiss DS., Bartha T., Frenyo VL., Horvath TL., Zsarnovszky A.: **Ligand-dependent estrogen and thyroid hormone receptor mRNA expression is**

modulated by the glia, p1-71, In: *15th Meeting of the Hungarian Neuroscience Society*, Budapest, Hungary, 2015.

Jocsak G., Toth I., Somogyi V., Kiss DS., Bartha T., Frenyo VL., Zsarnovszky A.: **Effects of bisphenol-A on cell viability in developing cerebellar cell culture**, P6-6, In: *The Joint Meeting of the Federation of European Physiological Societies and the Baltic Physiological Societies*, Kaunas, Lithuania, 2015.

Jocsak G., Toth I., Kiss DS., Ashaber M., Barany Z., Bartha T. Frenyo VL., Zsarnovszky A.: **Effects of zearalenone on the expression level of estrogen- and thyroid hormone receptors in the developing cerebellum**, P2-125, In: *16th Meeting of the Hungarian Neuroscience Society; International Brain Research Organization International Workshop*, Budapest, Hungary, 2016.

Jocsak G., Toth I., Kiss DS., Bartha T., Frenyo VL., Zsarnovszky A.: **The effects of zearalenone on the expression level of thyroid- and estrogen hormone receptors in the developing cerebellum, a likely mechanism for endocrine disruption**, 1624-E009, In: *10th Meeting of Federation of European Neuroscience Societies*, Copenhagen, Denmark, 2016.

Magyar konferencia kiadványokban megjelent összefoglalók

Jócsák Gergely, Tóth István, Bartha Tibor, Frenyó V. László, Zsarnovszky Attila: **Ösztrogén, pajzsmirigyhormonok és biszfenol a hatása az ösztrogén- és pajzsmirigyhormon receptorok expressziójára fejlődő kisagyban**. Akadémiai beszámoló (előadás)

Jócsák Gergely, Bartha Tibor, Goszleth Gréta, Zsarnovszky Attila: **Ösztrogén, pajzsmirigyhormonok és a zearalenon hatása az ösztrogén- és pajzsmirigyhormon receptorok expressziójára fejlődő kisagyban**. Akadémiai beszámoló (előadás)

Jócsák Gergely, Tóth István, Bartha Tibor, Frenyó V. László, Zsarnovszky Attila: **A 4-metilbenzilidén kámfor hatása az ösztrogén- és pajzsmirigyhormon receptorok expressziójára fejlődő kisagyban, önmagában, ösztrogén és pajzsmirigyhormonok jelenlétében**. Akadémiai beszámoló (előadás)

Az értekezésben nem tárgyalt közlemények

Impact factorral rendelkező tudományos folyóiratokban megjelent cikkek

Kiss DS., **Jocsak G.**, Zsarnovszky A.: **Az inzulin szerepe a táplálékfölvétel központi idegrendszeri szabályozásában**, *Magyar Állatorvosok Lapja*, 134(10):635–640, 2012. (IF: 0.185)

Toth I., Kiss DS., **Jocsak G.**, Somogyi V., Toronyi E., Bartha T., Frenyo VL., Horvath TL., Zsarnovszky A.: **Estrogen- and Satiety State-Dependent Metabolic Lateralization in the Hypothalamus of Female Rats**, *PLoS ONE*, 10(9):e0137462, 2015. (IF: 3.234)

Borbély S., **Jocsak G.**, Moldován K., Sedlak E., Preininger E., Boldizsar I., Toth A., Atlason PT., Molnar E., Vilagi I.: **Arctigenin reduces neuronal responses in the somatosensory cortex via the inhibition of non-NMDA glutamate receptors**, *Neurochem Int.* 97:83-90. 2016. (IF: 3.385)

Kiss DS., Toth I., **Jocsak G.**, Sterczler A., Bartha T., Frenyo VL., Zsarnovszky A.: **Preparation of purified perikaryal and synaptosomal mitochondrial fractions from relatively small hypothalamic brain samples**, *MethodsX*, 3:417–429, 2016. (IF: -)

Barany Z., Sterczler A., **Jocsak G.**, Frenyo VL., Kiss DS.: **A hepaticus encephalopathia kóroktana, patogenezisének újabb aspektusai (The etiology and some new pathophysiological aspects of hepatic encephalopathy)** *Magyar Állatorvosok Lapja*, 139(3):157-168, 2017. (IF: 0.185)

Nemzetközi konferencia kiadványokban megjelent összefoglalók

Borbely S., **Jocsak G.**, Sedlak E., Borsodi L., Boldizsar I., Atlason P., Molnar E., Vilagi I.: **Biologically active lignan arctigenin effectively reduces neuronal excitability**, *EPILEPSIA* 50, (S10) p. 79. 2009.

Borbely S., Toth A., **Jocsak G.**, Molnar E., Detari L., and Vilagi I.: **Neuronal excitability is dose-dependently lessened by plant lignan arctigenin via inhibition of kainate receptors**. *Frontiers in Neuroscience*, vol: 4. 2010.

Vilagi I., Borbely S., **Jocsak G.**, Sedlak E., Boldizsar I., Gyurjan I., Atlason P., Molnar E., Preininger E.: **Arctigenin, a plant lignan, dose-dependently reduce the neuronal excitability via inhibition of kainate receptors**, B34, *In: 7th Meeting of Federation of European Neuroscience Societies*, Amsterdam, The Netherlands, 2010.

Kiss DS., Toth I., **Jocsak G.**, Bartha T., Frenyo VL., Zsarnovszky A.: **Mitochondrial metabolic lateralization in the rat hypothalamus**, P141, In: *International Brain Research Organization International Workshop*, Debrecen, Hungary, 2014.

Toth I., Kiss DS., **Jocsak G.**, Somogyi V., Bartha T., Frenyo VL., Zsarnovszky A.: **Metabolic lateralization in the hypothalamus: possible mechanism for cramming multiple functions into a small place**, FENS-0455, In: *9th Meeting of Federation of European Neuroscience Societies*, Milano, Italy, 2014.

Toth I., Kiss DS., **Jocsak G.**, Frenyo VL., Zsarnovszky A.: **A possible way to decrease "crowdedness" through functional asymmetry in the hypothalamus**, p10.19, In: *Meeting of Hungarian Physiological Society - Federation of European Physiological Societies*, Budapest, Hungary, 2014; *Acta Phys.* 211. 148, 2014.

Mandoki M., **Jocsak G.**, Somogyi V., Kiss DS., Toth I., Bartha T.: **Use of virtual patients in teaching veterinary physiology at the Faculty of Veterinary Science**, conference speech, In: *Meeting of Hungarian Physiological Society - Federation of European Physiological Societies*, Budapest, 2014; *Acta Phys.* 211. 49, 2014.

Toth I., Szabo C., **Jocsak G.**, Somogyi V., Kiss DS., Bartha T., Frenyo VL., Horvath TL., Zsarnovszky A.: **Impact of satiety state and testosterone on the metabolic lateralization in the male rat hypothalamus**, p1-72, In: *15th Meeting of the Hungarian Neuroscience Society*, Budapest, Hungary, 2015.

Toth I., Kiss DS., **Jocsak G.**, Somogyi V., Bartha T., Frenyo VL., Zsarnovszky A.: **Satiety state dependent metabolic sidedness in the hypothalamus of male rats**, P6-5, In: *The Joint Meeting of the Federation of European Physiological Societies and the Baltic Physiological Societies*, Kaunas, Lithuania, 2015.

Toth I., Kiss DS., Ashaber M., **Jocsak G.**, Barany Z., Bartha T., Frenyo VL., Zsarnovszky A.: **Metabolic asymmetry in the hypothalamic regulation of food-intake and reproductive processes in male and female rats**, P2-124, In: *16th Meeting of the Hungarian Neuroscience Society; International Brain Research Organization International Workshop*, Budapest, Hungary, 2016.

Barany Z., Kiss DS., Toth I., **Jocsak G.**, Ashaber M., Sterczer A., Bartha T., Frenyo VL.: **Effect of ammonia on alpha-ketoglutarate production in primary astrocyte culture**, 1496-C108, In: *10th Meeting of Federation of European Neuroscience Societies*, Copenhagen, Denmark, 2016.

Toth I., Kiss DS., Ashaber M., **Jocsak G.**, Barany Z., Bartha T., Frenyo VL., Zsarnovszky A.: **Hypothalamic asymmetry in the regulation of food-intake and reproduction in male**

and female rats, 2090-E007, In: *10th Meeting of Federation of European Neuroscience Societies*, Copenhagen, Denmark, 2016.

Magyar konferencia kiadványokban megjelent összefoglalók

Somogyi Virág, **Jócsák Gergely**, Tóth István, Kiss Dávid Sándor, Goszleth Gréta, Bartha Tibor, Frenyó V. László, Zsarnovszky Attila, Sterczler Ágnes: **A hepaticus encephalopathia hatása a fejlődő idegrendszerre: az ösztrogén- és pajzsmirigyhormon receptorok mRNS expressziójának vizsgálata kisagyi sejten**

Kiss Dávid Sándor, Tóth István, **Jócsák Gergely**, Goszleth Gréta, Bartha Tibor, Frenyó V. László, Zsarnovszky Attila: **A jóllakottság és tesztoszteron hatása a hypothalamus metabolikus féloldaliságára hím patkányban**

Bárány Zoltán, **Jócsák Gergely**, Kiss Dávid Sándor, Sterczler Ágnes: **Az alfa-ketoglutarát, mint lehetséges biomarker hepaticus encephalopathia esetén**

Diplomamunka és TDK munka irányítása

Haraszi Zsuzsanna: **A pajzsmirigy-és ösztrogén receptor proteinek expresszióját károsító anyag, a kámfor vizsgálata fejlődő primer kisagyi sejt kultúrán**, TDK dolgozat, 2016, Témavezetők: **Jócsák G.**, Toth I.

Bagó Bálint: **A zearaleon (ZEA) hatása az ER és TR kifejeződésére fejlődő primer kisagyi sejt kultúrában**, TDK dolgozat, megjelenés várható időpontja: 2017, Témavezetők: Kiss DS., **Jócsák G.**

Fetter Viktória: **Asztroglia sejtek interleukin termelése oxidatív stress hatására**, TDK dolgozat, megjelenés várható időpontja: 2017, Témavezetők: **Jócsák G.**, Bárány Z.