

Állatorvostudományi Egyetem

Élettani és Biokémiai Tanszék



**EGY ISMERT MIKOTOXIN, A ZEARALENON
HATÁSA FEJLŐDŐ KISAGYI SEJTEK ÖSZTROGÉN
ÉS PAJZSMIRIGYHORMON
RECEPTORFEHÉRJÉINEK EXPRESSZIÓJÁRA**

Készítette: **Bagó Bálint**

VI. évfolyam

Témavezető: **Jócsák Gergely**

tudományos segédmunkatárs, Élettani és Biokémiai tanszék

Budapest 2017

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	4
1. Bevezetés.....	5
2. Irodalmi áttekintés.....	6
2.1 Zearalenon	6
2.1.1 A zearalenon a szervezetben.....	7
2.1.2 A zearalenon hatásmechanizmusa	8
2.2 Ösztrogének	9
2.2.1 Az ösztrogének szerkezete.....	9
2.2.2 Az ösztrogének szerepe.....	9
2.2.3 Az ösztrogénreceptorok és az ösztrogének hatásmechanizmusa.....	9
2.2.4 Az ösztrogének hatása a központi idegrendszer fejlődésére.....	10
2.3 Pajzsmirigy hormonok.....	12
2.3.3 A pajzsmirigy hormon receptorok és működésük.....	12
2.3.2 A pajzsmirigy hormonok szerepe a központi idegrendszer fejlődésében.....	13
2.4 Kisagyi szemcsesejtek	14
3. Célkitűzések	15
4. Felhasznált anyagok és módszerek	16
4.1 Állatok	16
4.2 A sejtkultúra létrehozása	16
4.3 Kezelések.....	16
4.4 Western Blot mérés	17
4.5 Adatelemzés.....	18
5. Eredmények.....	19
5.1 ER β expresszió változás a kezelés hatására	19
5.2 TR β expresszió változás a kezelés hatására	20

5.3 TR α expresszió változás a kezelés hatására	21
6. Megbeszélés	22
Summary	26
Összefoglalás.....	27
Irodalomjegyzék.....	28
Köszönetnyilvánítás	36

Rövidítések jegyzéke

D2	Jodotironin-dejodináz
D3	Jodotironin-dejodináz
E2	17-béta ösztradiol
ED	Endokrin diszruptor
ER	Ösztrogén receptor
ERE	Estrogen response elements
RBA	Receptor binding affinity
T4	Tiroxin
T3	Trijódtironin
TSH	Pajzsmirigyserkentő hormon
TR	Pajzsmirigyhormon receptor
TRE	Thyroid hormone response element
ZEA	Zearalenon

1. Bevezetés

Az endokrin diszruptorok (ED) olyan anyagok, amelyek a szervezetben képesek egyes hormonok hatását blokkolni, utánozni, esetleg befolyásolni, ezzel megzavarva az egészséges szervezetben zajló biokémiai és élettani folyamatok működését. Ezekkel az anyagokkal, vegyületekkel gyakran találkozhatunk mindennapi életünk során, hiszen megtalálhatóak a környezetünkben, élelmiszerekben, kozmetikumokban, gyógyszerekben, használati tárgyakban is. Olyan ismert anyagok tartoznak az ED kategóriába mint a dioxinok, DDT, ólom, vagy akár a koffein [1].

Az endokrin diszruptoroknak való kitettség negatív hatással lehet az egyed normális fejlődésére, megzavarva az endokrin rendszert, gátolva vagy stimulálva a hormonok termelődését, így megváltoztatva az általuk szabályozott élettani funkciókat. Az egyedfejlődésre való hatást ún. modifikációs, míg a kifejlett egyedre történő hatást aktivációs hatásnak nevezzük. Ezzel a tulajdonságukkal neurológiai, szaporodásbiológiai, keringési, metabolikus és immunológiai zavarokat okozhatnak [1]. Az ED-k változatos szerkezettel, kémiai tulajdonságokkal rendelkeznek. Hatásuk szerteágazó, ugyanazon anyag különböző fajokra és fejlődési stádiumokra is eltérő hatással lehet. Közöttük nagyszámú kémiailag stabil vegyület található meg, melyek a táplálékláncban feldúsulhatnak. Az ilyen ED-k nem csak a vadvilágot, de az embereket is veszélyeztethetik, környezeti kártételük hosszú távon is jelentős lehet [1], [2].

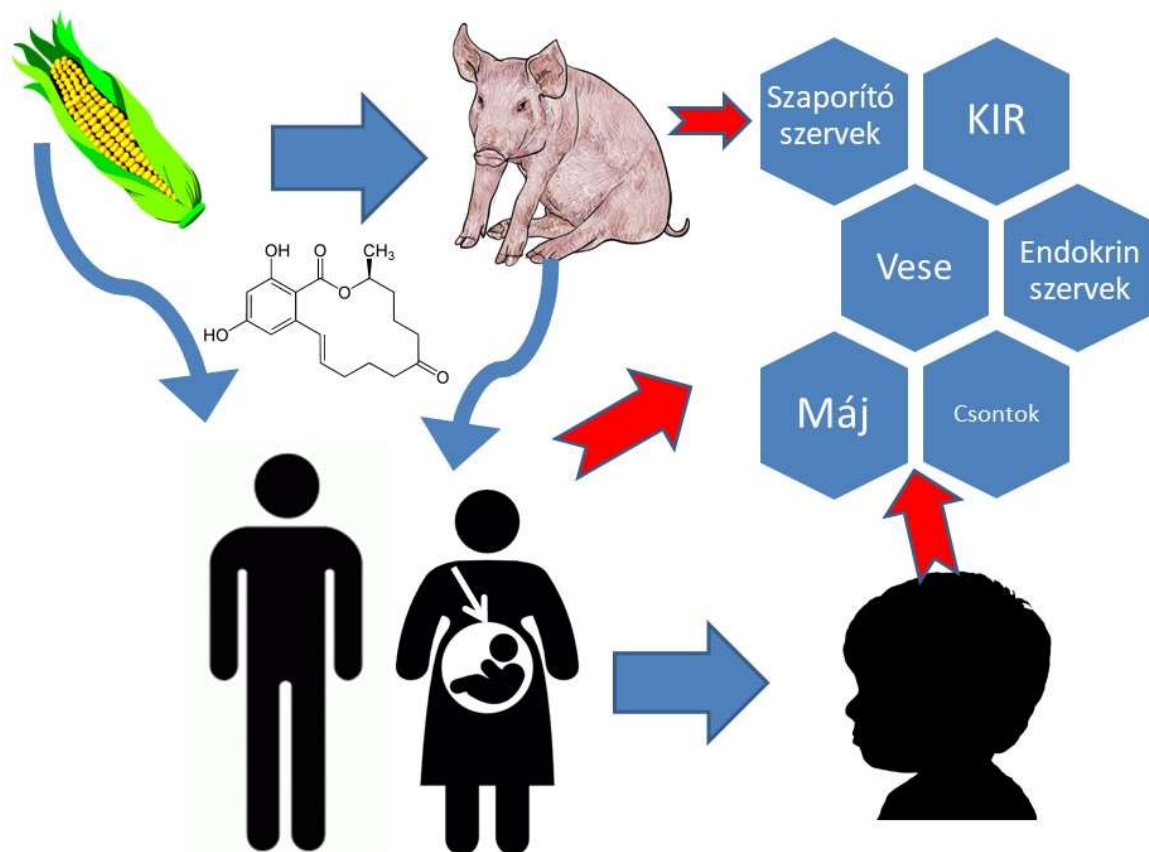
Jelentős mennyiségű ismert és lehetséges negatív hatásai miatt az ED-k egyre inkább a figyelem középpontjába kerülnek, folyamatosan fedeznek fel újabb és újabb anyagokat melyek hormonszerű tulajdonságokkal rendelkeznek. Jelenleg több mint 1000 potenciális ED-t ismerünk, és ez a szám folyamatosan nő, ezért fontos e vegyületek minél alaposabb tanulmányozása, esetleges káros hatásai megismerése. Dolgozatomban egy, az állategészségügyben jól ismert képviselőjüket, a zearalenont (ZEA) fogom bemutatni.

2. Irodalmi áttekintés

2.1 Zearalenon

A zearalenon, egy makrociklikus β -resorcilsav lakton, *Fusarium* fajok - köztük a *F. culmorum*, *F. roseum* - másodlagos metabolitja. Ezek a gombafajok világszerte megtalálhatóak melegebb klímájú területeken termesztett gabonaféléken, anyagcseretermékeikkel szennyezve a takarmányt és az élelmiszereket a világ szinte minden pontján [3]. Egy Magyarországon végzett felmérés során a kukoricából vett minták 41 %-t a búzából vett minták 17 %-t találták ZEA-nal szennyezettnek [4]. A nem megfelelő tárolás miatti magas hőmérséklet és nedvességtartalom kedvez a gombák elszaporodásának, ezáltal tovább növelve a termény fogyasztásával járó kockázatot [5]. Emellett a vegyületet feldolgozott gabonatermékekben is kimutatták, mint kenyér vagy a sör [6], [7], ami azt jelentheti, hogy a ZEA elég stabil vegyület ahhoz, hogy a tárolás, feldolgozás után is megtalálható legyen az élelmiszerekben és az állati takarmányokban egyaránt [8].

A mikotoxinnal szennyezett gabona elfogyasztásával a ZEA eljut a tápcsatornába ahol igen gyorsan felszívódik és a vérárammal szétterjed a szervezetben. Az ilyen takarmányt fogyasztó állat teje, húsa [9], [10], vagy akár tojása [11] is tartalmazhatja a toxint, így közvetett módon mind a szopós korban lévő fiatal állat, mind az állati termékeket fogyasztó ember is ki lehet téve a ZEA hatásainak [12] (1.ábra).



1.ábra: A zearalenon útja a táplálékláncban. Lipofil tulajdonsága miatt képes a placentán keresztül a fejlődő magzat és tejjel pedig az újszülött szervezetébe jutni. Az élőlényekbe bejutva elsősorban az ábrázolt szervek működését zavarja meg.

2.1.1 A zearalenon a szervezetben

A ZEA szervezetre gyakorolt hatásai az ösztrogénekhez hasonló viselkedésével áll összhangban: patkányoknál a *per os* ZEA adagolás osteopetrosist, a here és a thymus atrófiáját, a tobozmirigy és endometrium hyperplasiáját, csökkent termékenységet és a hüvely hyperkeratinizációját okozta [8]. Pontyoknál immunotoxikus és genotoxikus hatását mutatták ki [13]. A diszruptor hatása fajonként és életszakaszonként eltérő, a prepubertás korú sertések az egyik legérzékenyebbek a toxinra [9].

Nőkben előforduló endometriális adenocarcinoma szövetében is kimutattak ZEÁ-t. Yu és munkatársai [14] leírták, hogy alacsony koncentrációjú ZEA *in vitro* stimulálta a tumorsejtek proliferációját. MCF-7 ösztrogén receptor pozitív tumorsejtvonalon serkentette a növekedést és csökkentette az apoptózist.

A központi idegrendszer, bár a vér-agy gát segítségével ellenálló sok káros hatással szemben, de mégis a ZEA hatásának egyik kiemelt szervrendszere magas ösztrogénreceptor (ER) tartalma miatt [15]. A ZEA jó lipidoldékonysága következtében könnyedén átjut a vér-agy gáton [16], illetve károsítja azt. A károsodott vér-agy gát ezek után kevésbé lesz rezisztens a további kórokozókra, toxinokra [17], [18]. A ZEA a központi idegrendszerbeli hatásaira jelenleg kevés szakirodalmi adat áll rendelkezésre. A hipotalamuszban serkenti a kisspeptin szekrécióját, amely korai pubertáshoz vezetett patkányoknál [19]. Az agyalapi mirigy kóros mértékű megnövekedését okozva [20] az egész szervezet hormonháztartását befolyásolhatja, amely káros hatással lehet egyéb szervekre is [21].

2.1.2 A zearalenon hatásmechanizmusa

A hasonló szerkezetük miatt képes kötődni az α és a β ösztrogénreceptorhoz is, melyek közül az α ösztrogén agonistaként, míg a β részleges antagonistaként viselkedik [22]. Hatékonysága viszont jóval elmarad a 17- β ösztradioltól: MMV-Luc, ösztrogénre érzékeny sejtvonalon a zearalenon EC₅₀ értékét a hormonhoz képest több mint százszorosára mérték [23]. A receptorhoz való kapcsolódás során a képződött dimer ugyanúgy stimulálja a transzkripciót, mintha egy endogén ösztrogén dimerizált volna a receptorral. Emellett indirekt módon növeli a progeszteron receptorok mennyiségét is. [23].

A ZEA hatásának megértése elképzelhetetlen az ösztrogén és receptorai működésének bemutatása, megismerése nélkül, ugyanis egyik fő célpontja az ösztrogénreceptorok

2.2 Ösztrogének

Az ösztrogénekről általában női nemi hormonként a szaporodásban betöltött szerepük juthat eszünkbe, pedig az utóbbi évek során rengeteg új funkcióját tárták fel ennek a hormoncsoportnak.

2.2.1 Az ösztrogének szerkezete

Az endogén ösztrogének alapváza egy 18 szénatomból álló szteroid váz, ehhez kapcsolódik 3-béta-pozícióban egy hidroxil csoport és a D gyűrűre egyéb, az aktivitást meghatározó csoportok kapcsolódnak. A legfontosabb az ösztrogének közül a 17béta-ösztradiol (E2), mely a szteroidvázas ösztrogének csoportjában a legnagyobb relatív receptorkötődési affinitással (receptor binding affinity – RBA) rendelkezik [24].

2.2.2 Az ösztrogének szerepe

Az ösztrogéneknek szerteágazó szerepük van, hiszen rengeteg különböző szövet fejlődésére, differenciálódására, és működésére vannak hatással. Szerepet játszanak a nőknél például a csontanyagcserében [25], a szekunder nemi jellegek kialakulásában, a női nemi ciklus szabályozásában, lipoprotein szintézis és a sejtek inzulinérzékenységének módosításában [26].

Ezen kívül fontos szerepet játszanak az emlősök agyi folyamataiban is, a jól ismert hipotalamikus hormontermelés feedback szabályozásától kezdve, a motoros viselkedés szabályozásán át, a központi idegrendszer fejlődésében játszott szerepéig (pl. mielinizáció, idegpályák szerveződése, neuropeptidok és –transzmitterek expressziója) [27].

2.2.3 Az ösztrogénreceptorok és az ösztrogének hatásmechanismusa

Az ösztrogén és a hozzá hasonló vegyületek a szteroid magreceptor családba tartozó alfa és béta (ER α és β) ösztrogén receptorokon fejtik ki hatásukat, de egyes esetekben a sejtmembránon található, G-protein kapcsolt receptorokat is aktiválhatnak. Ahhoz, hogy a ligandok kötődni tudjanak ezekhez a receptorokhoz, átdiffundálnak a sejtmembránon, majd homodimerizáció során egy komplexet (dimer) képeznek [28]. A két receptor altípus ligandkötő domain-jának (ligand binding domain LBD) aminosav sorrendje 53%-os egyezést mutat, míg a DNS-kötő domainjénél (DNS binding domain DNB) ez az egyezés 96% [24], [29]. A receptor és ligandja által képzett dimer ugyanannak az ösztrogén-érzékeny génnek hormonválasz régiójához kötődik, viszont különböző ligandokhoz való affinitásuk eltérhet. Az

E2 jobban kötődik az α mint a β receptorhoz [27], így az alfa receptor túlsúllyal rendelkező szöveteken erősebb hatást vált ki. A hormonválasz elemhez kötődés aktiválja az adott gént, amellyel szabályozhatja a génről történő transzkripciót. Ezek receptorok, a szervezet rengeteg különböző szövetében megtalálhatóak, eltérő mennyiségben és arányban. Így meg tudunk különböztetni klasszikus, és nem klasszikus ösztrogén célszöveteket: a klasszikus célszövetekben főleg alfa ösztrogénreceptorok találhatóak. Ilyen a máj, a méh, a placenta, tejmirigy és a központi idegrendszer, a kardiovaszkuláris rendszer és a csontszövet. A nem klasszikus célszövetekben alfa ösztrogénreceptorok alig találhatóak, főleg béta szubtypussal találkozhatunk. Ezek közé tartozik például a tobozmirigy, herék, petefészek, bőr, hasnyálmirigy, vagy a központi idegrendszer tanulással és memóriával kapcsolatos területei [28], [29]. A receptorok számának szabályozása főképp ösztrogén indukálta autoregulációval történik, de a különböző szövetekben eltér egymástól. Például a csontszövet mezenhimális őssejtjeiben az ösztrogén növeli az alfa és csökkenti a béta receptorok expresszióját. Nem ivarérett patkányban az ösztrogénkezelés csökkentette a méhben, de újszülött hímeknél növelte a béta receptorok mennyiségét a prosztatában [29].

2.2.4 Az ösztrogének hatása a központi idegrendszer fejlődésére

Az ösztrogének kiemelkedően fontos szerepe van a központi idegrendszer megfelelő fejlődésében és működésében, és ezek mellett a központi idegrendszer szerepet játszik a hormonok szintézisében is. Az agy egyes részein, mint a hipotalamusz és a limbikus rendszer területén, a középgagyban, vagy az agykéregben található idegsejtek közül bizonyos neuronok tartalmaznak egy aromataz citokróm P450 nevű enzimet. Ez az enzim katalizálja az androgének ösztrogénekké való átalakulását [30]. Az aromataz-aktivitás az élet során folyamatosan változik, a legmagasabbnak a perinatális időszakban mérték [27]. Ennek a jelentősége abban áll, hogy ebben és a neonatális időszak során, a hímnemű újszülöttek heréi által termelt androgéneket ezek az enzimek ösztrogénné alakítják, amely részt vesz az agy ebben az időszakban lezajló szexuális differenciációjában. Ezért a hímek agyában sokkal nagyobb arányban találhatóak meg az ösztrogén és receptora által képzett dimerek, mint a nőstény vagy ivartalanított hím patkányok idegsejtjeiben [31]. Az ösztrogén receptorok a vemhesség 21. napján jelennek meg először és a születés utáni 6. napon találhatóak meg legnagyobb mennyiségben az agy egyes területein: legfőképpen a limbikus rendszer területein, de kisebb mennyiségben többek között az agytörzsben, és a kisagyban is [31].

Az ösztrogén többféle módon szabályozza a központi idegrendszer fejlődését. A fő szabályozó mechanizmus a magreceptorokon történik, de sok tanulmány leírja, hogy egyéb gyors, specifikus kaskádok is képesek aktiválni a sejten belül. Egyes sejttípusokban az E2 képes aktiválni többek között az adenilát-cikláz enzimet, növelni az intracelluláris kalcium koncentrációt, serkenteni a nitrogén-monoxid szintézist, növelni a ciklikus adenilát cikláz koncentrációt ami aktiválja a protein kináz G enzimet. Ezt nevezzük nem genomális (rapid) útnak [32][33]. A rengeteg, ösztrogén által szabályozott folyamat közül az idegrendszeri fejlődés szempontjából érdemes kiemelni az ERK1/2 MAPK-útvonalat, amely fontos szerepet játszik az ideg- és glia-sejtek növekedésében és differenciációjában. Ennek során az E2 stimulálja az ERK1/2 enzim foszforilációját. Ezen kívül azt találták, hogy ezen útvonal növelte a nem programozott sejthalál mennyiségét egy adott szemcsesejt populáción belül. Az ösztrogén hatása a fejlődés kritikus szakaszaiban jelentősen befolyásolja a sejtek mennyiségi egyensúlyát az agyban és ezen belül a kisagyban is az osztódás, differenciáció, sejtmigráció és sejthalál szabályozásával [34], [33].

2.3 Pajzsmirigy hormonok

A pajzsmirigy által termelt tiroxin (T₄) és trijód-tironin (T₃) fontos szerepet játszik szinte az összes szövetféleség anyagcseréjében, differenciációjában, így a központi idegrendszerében is [35]. A T₄ egy hormonálisan inaktív molekula, viszont a pajzsmirigyben nagyobb részt a T₄ szekretálódik. Ezt a tiroxin 5'-dejodináz enzim alakítja aktív T₃-á. Ez az enzim nagy mennyiségben található meg a magzati és újszülöttkori szövetekben, ami arra utal, hogy a kezdeti fejlődés során a T₃ nagy szerepet játszik a szervek, szövetek fejlődésében. Ezek közül behatóbban a jelenlegi dolgozat keretein belül a központi idegrendszerrel foglalkozunk. A T₃ az idegrendszer fejlődése során szabályozza az idegsejtek differenciálódását, migrációt, szinaptogenezist és a mielinizációt [36]. A tiroxin hiány a perinatális időszakban mentális és fizikális problémákhoz vezet, amit kreténizmusnak neveznek [37].

2.3.3 A pajzsmirigy hormon receptorok és működésük

A hormon hatása a sejtekben nagyrészt pajzsmirigyhormon receptorokon történik, melyek – hasonlóan az ösztrogén receptorokhoz – a nukleáris receptor-szupercsaládba tartoznak [38]. Emellett a citoplazmában és a mitokondriumon található pajzsmirigy receptorokon keresztül válthat ki egy gyors, sejtmagreceptoroktól független választ [39]. Ahhoz, hogy a T₃ és a T₄ hormonok kifejthessék hatásukat, át kell jutniuk a sejmembránon. Ezt olyan membrántranszporterekkel keresztül valósul meg, mint a monokarboxiláz transzporter 8, 10 (MCT8,10), szerves anion transzportáló peptidek (OATP), vagy az L-aminosav karrierek (LATS). Ezek közül például a MCT8 megtalálható egyes idegsejtekben, ezért fontos szerepe van a megfelelő agyi fejlődésben. Az ezzel a transzporterrel nem rendelkező emberek szenvednek az úgynevezett Allan-Herndon-Dudley szindrómában. MCT8 knockout egerekben a humánban tapasztalt elváltozások nem figyelhetőek meg. Ez más, ugyanazon idegsejteken található pajzsmirigyhormon transzporterekkel magyarázható, amelyek kompenzálják az MCT8 hiányt. A citoplazmában található jodotironin-dejodináz 2 és 3 (D2 és D3) enzimek szabályozzák a sejtben található T₃ mennyiségét, amely az aktuális hatásért felel. Ezek azért fontosak mert a T₃ körülbelül 80%-a D2 enzim segítségével helyben keletkezik. A D2 felelős a T₄ T₃-á való alakulásában, a D3 pedig inaktiválja a T₃-at [36].

Az aktivált T₃ a fő hatását a pajzsmirigyhormon magreceptorokon (TR) váltja ki. A TR-k három részegységből (domain) állnak: egy ligandkötő domain amely felel a receptor interakciókért is, egy DNS-kötő és egy nem tisztázott funkciójú rész. A DNS-kötő rész specifikus DNS szekvenciához, úgynevezett pajzsmirigyhormon-válasz elemhez (thyroid

responsive element; TRE) kötődik. Ehhez az elemhez a TR képes ligand nélkül, monomerként kötődni, de általában homo- vagy heterodimerként fejt ki hatását az adott génre. Heterodimert általában retinoid x receptorral képez. Ezek a hormonválasz régiók aktiválhatják, vagy inaktiválhatják az adott génről történő transzkripciót. Az úgynevezett „pozitív” elemek TR monomer hatására csökkentik, míg a dimerizált receptor kötődése serkenti az átírást az adott génről. A „negatív” elemek esetén ezek fordítottja következik be [40]. Jelenleg két TR típust ismerünk és azokon belül két-két altípust: az α 1-2 és a β 1-2. Az α receptor szubtypusok találhatóak például a májban vagy perinatálisan az agyban, a β kifejlett egyedek agyában, de a szívizom tartalmazza mindkét típust [39][41]. A kisagyban az α és a β típus is megtalálható: A TR α megtalálható a korai neuroepitheliumban, a granulumsejt precursorokon és később az EGL-eken. A TR β pedig általában a későbbi szakaszokban a purkinje sejt rétegben (Purkinje cell layer, PCL) és a mély belső rétegekben (internal deep layers, IDL) [36]. A fejlődés során ezek a szubtypusok egy meghatározott sorrendben jelennek meg [39].

2.3.2 A pajzsmirigy hormonok szerepe a központi idegrendszer fejlődésében

A T3 hormon fontos szerepet játszik az agy normális fejlődésében. Több kutatás megerősíti, hogy a központi idegrendszer fejlődése során fellépő pajzsmirigyhormon hiány – vagy többlet – irreverzibilis elváltozásokat okozhat. Indirekt és direkt hatással rendelkeznek többféle glia és idegsejttípus proliferációjára, differenciációjára és az apoptózisra [42]. Az ember magzati élete során a T3, T4 és pajzsmirigyserkentő hormon (TSH) a 12. hét, a pajzsmirigy működésének megkezdése előtt is kimutathatók, amely valószínűsíti, hogy az anyai pajzsmirigy hormonoknak nagy szerepük van a magzat agyi fejlődésében. Ennek ellenére a magzati pajzsmirigyhormon hiánnyal küzdő újszülötteknek adott TSH, biztosította, hogy közel normális szellemi fejlődést mutassanak [36]. Az öröklötten TR receptor hiányos (TR knockout) állatok agyi fejlődését vizsgálva, a receptor hiánya a fejlődésre alig volt hatással. Ez valószínűsíti a hormon olyan funkcióit is, mely során nem a transzkripciót szabályozza. Ilyen például a T4-nek az asztrocitákban kifejtett aktin polimerizációt indukáló hatása [36].

2.4 Kisagyi szemcsesejtek

A kisagyi szemcsesejtek a központi idegrendszer legkisebb, és legnagyobb számban megtalálható sejtjei közé tartoznak [43]. Mivel még a születés után is fejlődnek (egérben a 7. posztnatális napig), kiváló modell az idegsejtek fejlődésének tanulmányozásához[44]. Ezek a sejtek nem képesek a szteroidok *de novo* szintézisére, ezért szteroidmentes médiumban tenyésztve lehetséges csak a külsőleg hozzáadott hormonok, jelen esetben az ösztrogén és a pajzsmirigyhormonok hatásának vizsgálata. A kisagyi szemcsesejtek, ahogy a központi idegrendszer sejtjeinek jelentős része, ösztrogén és pajzsmirigyhormon receptorokat expresszálnak, a megfelelő fejlődés, és a homeosztázis fenntartása érdekében. Ezen tulajdonságai miatt használtunk primer patkány kisagyi szemcsesejteket a kísérletekhez, a sejt kultúrák készítéséhez, mint modellt, ezzel szimulálva az idegsejtek fejlődésében beállt káros hatásokat, amelyeket a ZEA kiválthat, ha felborítja a neuroendokrin rendszert.

3. Célkitűzések

A ZEA, mint ismert ED hatású vegyület, a szervezetbe jutva képes felborítani a neuroendokrin szabályozási mechanizmusokat, és ezzel befolyásolni a kifejlett emlősök, madarak hormonháztartását, illetve tönkretelheti az egyedfejlődés kényes mechanizmusainak egyensúlyát is.

Kísérletünk során arra kerestünk választ, hogy a fejlődő központi idegrendszer idegsejtjein – amelyekhez kisgyei szemcsesejteket használtunk modellként – található ER β , TR α és TR β receptorok expressziójának mértékére hatással van-e a ZEA, mint endokrin diszruptor vegyület.

Emellett megvizsgáltuk a ZEA hatását a fiziológiásan előforduló hormonok jelenlétében, és nélkülük is, így lehetőségünk nyílt a ZEA és az általa módosított endokrin rendszer hormonjai közti összefüggések vizsgálatára is.

4. Felhasznált anyagok és módszerek

4.1 Állatok

A TOXI-COOP Zrt.-től (Budapest, Magyarország) beszerzett Sprague-Dawley törzsbe tartozó vemhes patkány nőtények minimum 4 nappal az ellés előtt érkeztek meg. Az anyákat 12 órással nappal, és 12 órással sötét ciklusban tartottuk, *ad libitum* táp és ivóvíz mellett. Mivel korábbi eredmények alapján a kölykök neme nem befolyásolta a vizsgálatainkat, így hímeket és nőtényeket egyaránt használtunk. A születés napját posztnatális nulladik napként jelöltük, és a hetedik posztnatális napon történt meg a sejt kultúrát alkotó sejtek izolálása. Az állatok átlagos testtömege 18-20g között volt a hetedik posztnatális napon.

4.2 A sejt kultúra létrehozása

A primer kisagyi szemcsesejt-kultúrát a már publikált [45] metodika alapján állítottuk elő. Az állatok kisagyt gyors dekapitálást követően eltávolítottuk. Az agyszövetből izolált sejtek enzimátikus kezelés nélkül szérums- és szteroidmentes környezetben inkubáltuk Jakab és mtsai. módszerének megfelelően. A 7 napos inkubálási idő letelte és a kezeléseket megtörténte után a sejteket mechanikai úton betakarítottuk EDTA-s PBS oldat segítségével. A sejt kultúra gliatartalmának ellenőrzése GFP (Glial Fibrillary Acidic Protein) használatával történt. A kiültetés részletes metodikája, a sejt kultúrák glia tartalma és a sejtek tipizálása egy korábbi publikációban olvasható [46].

4.3 Kezelések

A sejt kultúrákat a kiültetést követő hetedik napon (P14) az alábbi endokrin diszruptorokkal és/vagy hormonokkal kezeltük (fiziológiásan előforduló koncentráció, ill. a környezeti szennyezés során mérhető koncentráció). 17β -estradiol (E2, 1.16×10^{-10} M, Sigma Aldrich Ltd., Magyarország, vízdékony); 3,3',5-triiodo- L-thyronine (T3, 0.92 nM, Sigma Aldrich Ltd., Magyarország); Zeralenone (Zea, 10^{-10} M) (1. táblázat).

	KONTROLL	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.
ZEA	-	+	-	+	-	+	-	+
E2	-	-	+	+	-	-	+	+
T3	-	-	-	-	+	+	+	+

1. táblázat: A ZEA ill. hormonkezelések a nyolc, kialakított csoport esetében. A kontroll csoportnál kezelést nem alkalmaztunk. A másik hét csoporthoz ZEA-t, E2-t vagy T3-t adtunk, illetve ezek kombinációját. Az alkalmazott kezeléseket a táblázatban '+'-al jelöltem.

4.4 Western Blot mérés

A miután megtörtént a sejtek betakarítása a mintákhoz a gyártó utasításainak megfelelően lízis puffert (M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent, Thermo Scientific) és proteáz inhibitorot adtunk (HALT Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail, Thermo Scientific), majd 5x5 másodperces ultrahangos homogenizálás után a minták fehérjekoncentrációját egy bicinchoninsav fehérje próba (BCA; bicinchoninic acid protein assay kit; Thermo Scientific) segítségével mértük meg. A Western blot analízis során a mintákat 10%-os poliakrilamid gélben (Precise Tris-Glycine Gel, Thermo Scientific) futtattuk. Miután megtörtént fehérjék molekulásúly szerinti szétválasztása, a fehérjéket egy PVDF (Immobilon-P, Millipore) membránra vándoroltattuk. A membrán még megmaradt szabad kötőhelyeit 5%-os, zsírintes tejjel blokkoltuk egy órán keresztül, majd az általunk vizsgált fehérjéket TBS-T (Tris-Buffered Saline with Tween) oldatban, a megfelelő ellenanyagok (Primer ellenanyagok: Anti-thyroid hormone receptor alpha, Abnova, PAB11276, hígítás: 1:1000; Anti-estrogen receptor beta, Sigma Aldrich, E-1276, hígítás: 1:1000; Anti-thyroid hormone receptor beta, Abnova, PAB11277, hígítás: 1:1000. Szekunder ellenanyagok: Peroxidase labeled horse anti-mouse IgG, Vector Laboratories, PI-2000, hígítás: 1:2000 Peroxidase labeled goat anti-rabbit IgG, Vector Laboratories, PI-1000, hígítás: 1:2000;) segítségével jelöltük meg. A megjelölt fehérjesávokat kemilumineszcencia (Western Lightning Chemiluminescence C.N. PerkinElmer) segítségével láthatóvá tettük röntgenfilmen, majd a kapott jeleket denzitometriás analízisnek vetettük alá. Legalább három mérés eredményéből átlagoltuk az egyes csoportokat. Az optikai denzitásértékeket a kezeletlen kontroll mintából mért értékekhez viszonyítottuk.

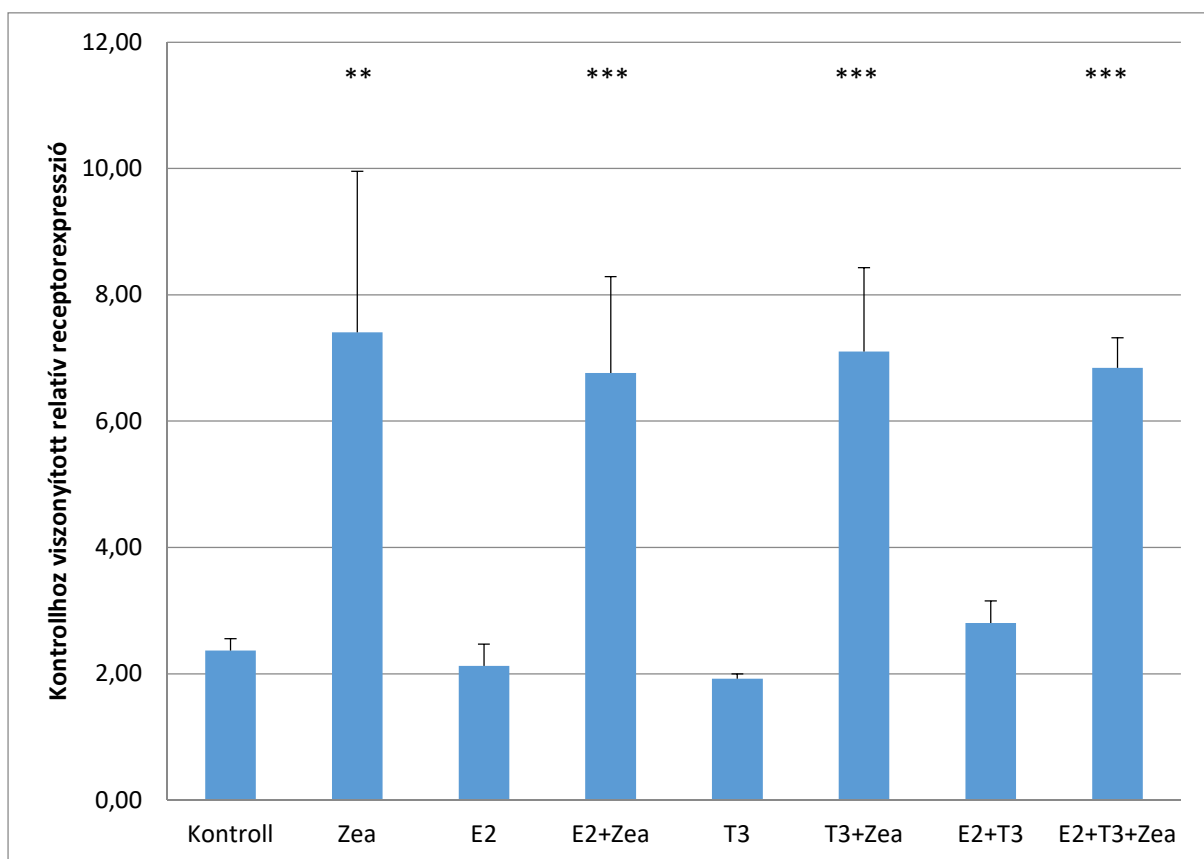
4.5 Adatelemzés

A statisztikai analízisként használt egytényezős ANOVÁ-t Tukey-féle teszttel kiegészítve az ÁTE Biomatematikai tanszék végezte el. Az adatokat az EXCEL (Microsoft, Microsoft Co., Redmond, WA, USA) és a GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA) program segítségével végeztük el.

5. Eredmények

5.1 ER β expresszió változás a kezelés hatására

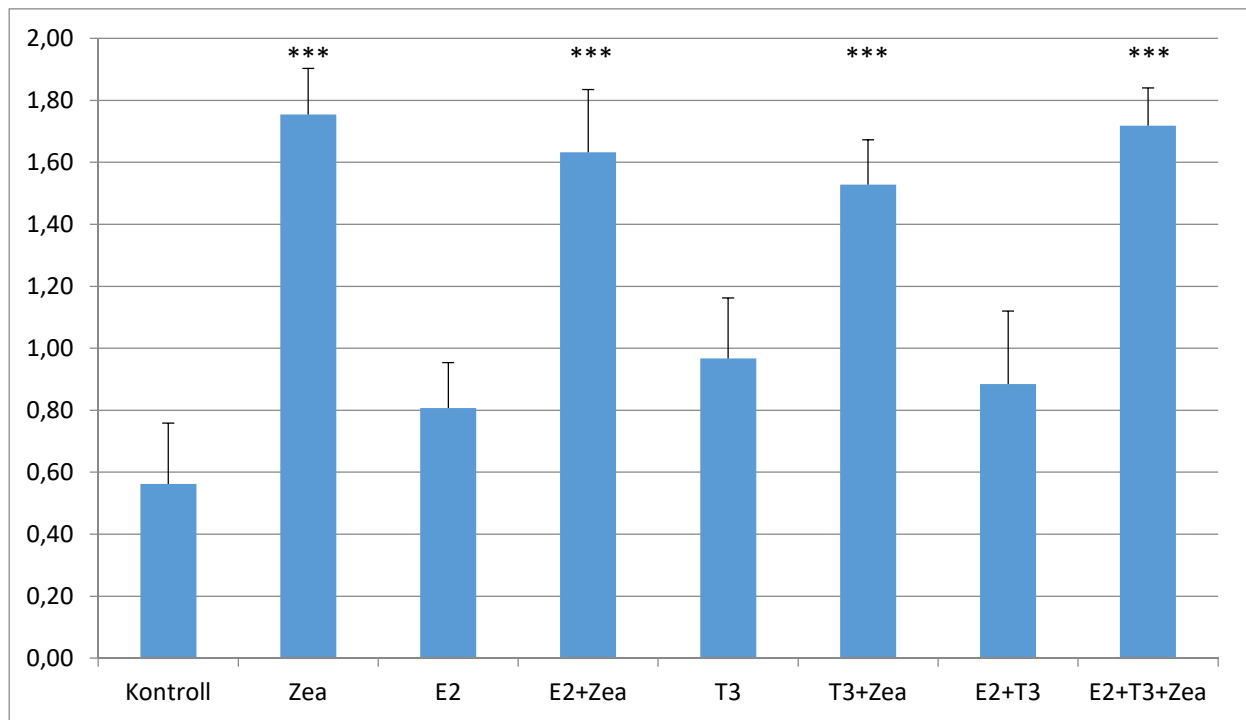
A tenyészetek zearalenonnal való kezelése, a mikotoxinnal nem kezelt tenyészetekhez képest az ER β receptorfehérje mennyiségének szignifikáns növekedését eredményezte minden esetben (2. ábra). A kontroll csoporthoz ($2,37 \pm 0,19$) viszonyítva a ZEA alkalmazása több mint háromszorosára emelte a receptorok számát ($p < 0,01$), hasonlóan, mint az E2-lal kezelt sejtek esetében ($p < 0,001$). Számottevő növekedést idézett elő a T3-nal önmagában, és E2-lal történt együttes adagolásánál is ($p < 0,001$). A T3 és E2 együttes alkalmazása a sejtek receptorfehérje expresszióját jelentősebben serkentette, mint amit a kizárólag T3 ill. az E2 kezelést követően tapasztaltunk.



2.ábra, Kontrollhoz viszonyított ER β expresszió a ZEA-nal kezelt és kezeletlen sejtenyészetekben. A *-ok mutatják a ZEA-nal kezelt és nem kezelt csoport között létrejövő szignifikáns mennyiségbeli különbséget.***: $p < 0,001$, **: $p < 0,01$

5.2 TR β expresszió változás a kezelés hatására

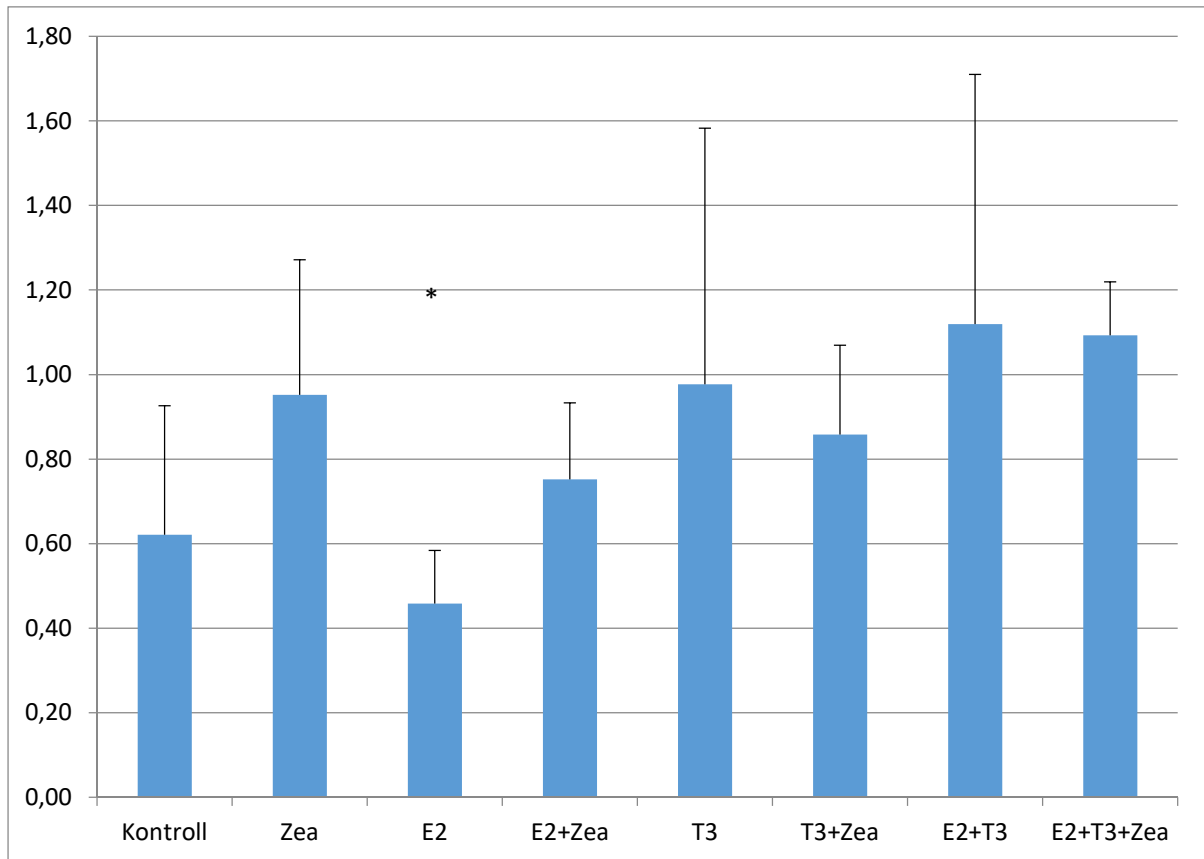
Hasonlóan az ER β -nál kapott eredményekhez, a ZEA alkalmazása jelentősen megnövelte a TR β mennyiségét a sejtekben ($p < 0,001$) (3. ábra). Minden esetben a ZEA-nal kezelt sejtek receptorexpressziója szignifikánsan magasabb volt a nem kezelt párjukhoz viszonyítva. Emellett T3 adagolása indukálta a receptorexpressziót a kontrollhoz viszonyítva, viszont a ZEA kezeléssel átesett tenyészeteknél csökkentette azt a sejtekben ($p < 0,05$).



3.ábra, Kontrollhoz viszonyított TR β expresszió a ZEA-nal kezelt és kezeletlen sejtenyészetekben. A *-ok mutatják, ha a ZEA-nal kezelt és nem kezelt csoport között létrejövő szignifikáns mennyiségbeli különbséget ***: $p < 0,001$,

5.3 TR α expresszió változás a kezelés hatására

A TR α esetében, bár minimális expressziót serkentő hatás felfedezhető, csak az E2-lal való kezelésnél lehetett tapasztalni szignifikáns eltérést ($p < 0,05$) a csak ZEA-nal kezelt csoporthoz képest (4. ábra). Emellett a mindkét hormont, és ZEA-t tartalmazó sejt kultúra receptorszám növekedése felülmúlta a ZEA+ T3-nal és a ZEA+ E2-lal kezelt csoportét (E2: $< 0,01$; T3 $< 0,05$).



4. ábra, Kontrollhoz viszonyított TR α expresszió a zearalenonnal kezelt és kezeletlen sejtenyészetekben. A * mutatja, ha a ZEA-nal kezelt és nem kezelt, de E2-lal kezelt csoport között létrejövő szignifikáns mennyiségbeli különbséget.

*: $p < 0,05$

6. Megbeszélés

A ZEA különböző szövetekre, sejtekre való hatásával egyre több kutatás foglalkozik. Bár ezek nagy része a sejt működésének nukleáris ösztrogénreceptorokon keresztüli befolyásolására fordítja a figyelmet, a ZEA egyéb, nem ösztrogén receptor függő sejtkárosító tulajdonságát vizsgáló irodalom is folyamatosan növekszik. Azt, hogy a diszruptor a célsejtre milyen hatással lehet, nagyban befolyásolja a koncentrációja [47]. A vegyület negatívan befolyásolja a fehérje- és DNS- szintézist, genotoxikus, csökkenti a mitokondriumok számát és fokozza oxidatív stressz által előidézett károsodás mértékét, mellyel a stresszfehérjék termelődését serkenti [48], [49]. Ezek a hatások érhetőek tetten a ZEA hepato- és nephrotoxikus tulajdonsága esetén [48], [50], [51].

Egy egészséges egyed szervezetében a neuroendokrin szabályozásnak köszönhetően a pajzsmirigyhormonok, az ösztrogének és mindezek receptorai egyensúlyban vannak. Ha egy zavaró "hatás" – jelen esetben a ZEA – éri ezt az egyensúlyt, az fejlődési rendellenességekhez, funkciózavarokhoz vezethet testszerte. Ez a fejlődő szervezetben például a nemi érés zavarához, meddőséghez [52], vagy korai pubertáshoz vezethet [53], [54]. Mivel mindkét hormon jelentős szerepet játszik az agyi struktúrák megfelelő kialakulásában [36], [55], hormonális zavarok a későbbi élet során maradandó neurológiai és viselkedési elváltozásokat is okozhatnak. Ezzel összhangban több beszámoló is megerősíti a túl magas vagy túl alacsony pajzsmirigyhormon-szint káros hatását a központi idegrendszer fejlődésében [53], [54], [55].

Az eredményeink és az irodalmi adatok alapján valószínűsíthető, hogy a ZEA up-regulációs hatással van az ER β mennyiségére, viszont ennek a mechanizmusa sajnos még nem ismert. A megnövekedett ER β mennyiség főleg a központi idegrendszerben és a szaporító szervrendszerben okozhat működési zavarokat, amely a feed-back szabályozás miatt kiterjedtebbé teheti ezeket, a teljes neuroendokrin rendszer károsodhat. Erre jó példa, hogy a ZEA az agyalapi mirigy hiperpláziáját okozhatja mely, az ott termelődő hormonok mennyiségére hatással lehet [20]. A gonadális hormonok és azok mennyiségi szabályozása tekintetében például Adibnia és munkatársai [59]) leírták, hogy a ZEA az ER expressziót befolyásoló és citotoxikus tulajdonsága negatívan befolyásolta hím patkányok reprodukciós folyamatait és a hím nemi hormonok szintézisét, amely jelenséget mások is megerősítették [23]. Fontos hangsúlyozni, hogy a ZEA-nak az ER expresszióra gyakorolt hatása függ a receptor altípusától. Bár a ZEA az ER β receptor expressziójára up-regulációs hatással van, az ER α mennyiségét mégis csökkenti. Mivel a két receptor aránya és expressziója szövetfüggő, a ZEA

hatása eltérően befolyásolhatja a hormonháztartást a különböző szervekben. Ennek a magyarázata, hogy a diszruptor az ER α receptornak agonistája, míg az ER β receptoron agonista-antagonistaként viselkedik[22]. Ezen tulajdonsága következtében gátolja az ER β receptor által kiváltott transzkripciót, melyet a sejt a receptor mennyiségének növelésével próbál ellensúlyozni [59]. Az ösztrogén háztartás zavara a magzati és az újszülöttkori idegrendszeri fejlődésre kifejezetten negatív hatással van. Az ER β génkiütött egereken végzett vizsgálatok a sejtmigráció és proliferáció zavarát, és apoptotikus sejtek megnövekedett számát írták le a nagyagykérgi neuronok esetében [60].

A ZEA a szaporító szervrendszerben hiperösztrogenizmus kialakulását okozza. Férfiaknál alacsony termetet hipogonadizmust, gynecomastiát (a férfi emlőszövet nem daganatos eredetű megszaporodása), impotenciát, nőknél a menstruációs ciklus zavarát, méh és az emlők kóros megnagyobbodását írták le az kórfolyamatok következtében [61]. Krónikus kitettség esetén nő az emlőtumor kialakulásának kockázata. A ZEA-ra az egyik legérzékenyebb állat, a sertés klasszikus hiperösztrogén tüneteket mutat: vulva ödémája és kipirosodása, ivarzási tünetek (pozitív hátalási próba), megnagyobbodott tejmirigyek, esetenként vetélés, vagina prolapsus is előfordulhat [62], [63].

Az eddigi kutatások közül kevesen foglalkoztak az ösztrogénszerű hatás mellett azzal, hogy a ZEA az ER receptorcsaládon kívül esetleg más hormonok működését is befolyásolni tudja. Így ezen a téren a pajzsmirigyhormon receptorok újdonságnak számítanak, de ugyanakkor az, hogy a szervezet szinte összes sejtjének, többek között a központi idegrendszer sejtjeinek fejlődésében, működésében fontos szerepet játszanak, indokoltá teszi vizsgálatukat.

Az eredményeink jól mutatják, hogy a ZEA képes befolyásolni a pajzsmirigyhormon receptorok mennyiségét, és különbség mutatkozik az alfa és a béta szubtípusra gyakorolt hatás között. Jól látható, hogy a kontrollcsoporthoz képest a ZEA-nal kezelt csoportok TR β expressziója szignifikánsan nőtt. A TR α változása nem szignifikáns, és nem is mutat egyértelmű tendenciát, csak abban az esetben, ha a kezelés során nem alkalmaztunk T3-at. A fejlődés során a TR α a korai, legfőképp a magzati fejlődésben játszik szerepet majd születés után mennyisége csökken, miközben a TR β mennyisége nő [41], [64]. Az irodalmi adatok alapján a ZEA nem kapcsolódik a pajzsmirigyhormon receptorokhoz, sem a TRE-khez, direkt módon nem hat a pajzsmirigyhormon-receptor útra [65]. Viszont az ERE és a TRE bázissorozatában található egy ún. konszenzus szekvencia, amely lehetővé teszi az ER kötődését a TRE-hez és fordítva. Ennek köszönhetően a két hormonális útvonal képes egymás génexpresszióját szabályozni [66]. Ez lehetőséget teremthet más, ösztrogénhatású anyagnak is

a pajzsmirigyhormon által szabályozott anyagcsereútvonalak működését befolyásolni. Emellett több ösztrogénhatású endokrin diszruptornál is kimutatták azt a hatást, hogy gátolja az úgynevezett proteasóma fehérjekomplexek működését. Ez a komplex felelős a többek között nukleáris receptorok lebontásáért. Ha a receptorok lebontása nem megfelelő, a mennyiségük megnő, relatív upreguláció alakul ki [67]. Ez a folyamat az ER és a TR upregulációjában is részt vehet. A relatív magas receptorszám felboríthatja a sejt hormonális egyensúlyát, és ha nincs gátlás, hipertireózishoz, hiperösztrogenizmushoz hasonló tüneteket válthat ki.

Mivel T3-nak kiemelkedő szerepe van a központi idegrendszer fejlődésében, a pajzsmirigyhormon háztartás egyensúlyának felborulása súlyos és hosszútávú következményekkel járhat. Patkányoknál, *postpartum* kísérletileg kiváltott hipertireózis korai sejtproliferációt és differenciációt vált ki, aminek negatív hatása a végleges sejtszám és sejtméret csökkenésében mutatkozik meg [68]. Emellett a myelinhüvely és az idegsejtek dendritjeinek normálistól eltérő fejlődése is a szellemi és kognitív képességek elégtelenségéhez vezethetnek [42]. A hyperthyreoid állatok rövidebb ideig élnek, több létfontosságú szerv, mint a szív és az agy károsodhat [69], [70]. A negatív hatások jelentős része oxidatív stressz kiváltásán alapul, amely károsítja a sejtet, leginkább a mitokondriumban okoz jelentős károkat [71], [72]. Oxidatív stressz kiváltását, a mitokondriumok számának csökkenését a ZEA citopatogén tulajdonságának vizsgálatakor is leírták [48]. A hipertireózis más hormonok homeosztázisát is felboríthatja, például megemeli a keringő tesztoszteron és E2 szintjét a plazmában, ami úgyszintén elváltozásokat okozhat [73]. Érdekesség, hogy a TR β -t nagy mennyiségben expresszáló neuroblastoma sejtekben T3 kezelés hatására a Herpes Simplex Virus-1 (HSV-1) replikációjának intenzitása csökkent [74].

Hogy a fiziológias környezetben fellépő hatásokat a lehető legjobban tudjuk modellezni, a kezeletlen kontroll és a ZEA-nal kezelt csoport mellett egyes csoportokat élettani mennyiségű E2-lal, T3-nal illetve ezek kombinációjával kezeltük. Ez az ER β és a TR β esetében, nem látható szignifikáns eltérés a kontroll csoport, a ZEA-nal kezelt csoport és ezek hormonnal kezelt megfelelői között. A TR α esetében az a tendencia figyelhető meg, hogy a T3 kezelt csoportoknál a receptor expressziója magasabb volt a nem kezelt csoportokhoz képest. A szakirodalmi adatok szerint a TR α mennyisége T3 kezelés hatására a patkány egyes szöveteiben (szív, vese, tobozmirigy) csökken, de az agyban nem változik. A TR β -ra a tobozmirigyen kívül nincs hatással a kezelés [75].

Az élő szervezeten belül a ZEA a hormontermelő szöveteken keresztül is ki tudja fejteni ED hatását, amely megnehezíti az *in vivo* vizsgálatok eredményeinek értelmezését. Több forrás

is megemlíti, hogy a toxin megnövelte a pajzsmirigy, mellékvesék és a *hypophysis* relatív és valós tömegét. Emellett a *hypophysis*re gyakorolt hatással közvetetten befolyásolhatja több endokrin mirigy működését is. [76].

Mivel a ZEA a világon szinte mindenhol előfordul, kiemelt figyelmet érdemel toxicitásának minél teljesebb körű megismerése. Napjaink gabonaalapú állattartásában ez a mikotoxin tetemes károkat okoz, és emellett az humán- egészségügyi vonatkozásban is különböző betegségek kialakulásának egyik lehetséges előidézője lehet. Ahogy kísérleteink és az irodalmi adatok mutatják, a ZEA több ponton is képes befolyásolni az egyedek hormonális egyensúlyát, mely az egész szervezetre kiterjedő károsodáshoz vezethet. Megértéséhez mindenesetre fontolóra kell venni a kutatás kiterjesztését *in vivo* kísérletek irányába.

Summary

Endocrine disruptors (EDs) are specific compounds with a potent modulatory effect on the human and animal endocrine function. Several molecules can act as an ED in our environment, and a growing body of evidence draws attention to their adverse health effects, however our knowledge is scarce about their exact actions. In this study, the effect of zearalenone (ZEA), a mycotoxin produced by *Fusarium* species, was examined *in vitro*.

Our experiments were focused on how ZEA treatment affects the estrogen receptor beta (ER β) and thyroid receptor alpha and beta (TR α & β) protein expression levels in developing neuronal cell cultures. Additionally, possible modulatory effects derived from 17 β -estradiol and triiodothyronine were examined, as well.

We isolated cerebellar granule cell cultures from 7-day-old Sprague-Dawley rat pups. After 7 days some of the cultures was treated with ZEA, others remained untreated as control. In order to test the possible modulatory effects of ZEA, we administered 17 β -estradiol, or 3,3',5-triiodo-L-thyronine, or the mixture of these hormones on some treated and untreated cultures as well. Western blot technique was used to measure the receptor levels.

Our results show that the ZEA treatment significantly increased the amount of expressed receptor proteins in all groups, compared to the ZEA-free cultures. According to our results, ZEA can influence the neuronal development in a manner more complex than we previously thought, it can act as a possible cause of many disorders related to reproduction and development in animal husbandry.

Összefoglalás

Környezetünkben rengeteg olyan anyag található, mely képes befolyásolni az emberek és állatok endokrin működését, ezért ezeket endokrin diszruptoroknak nevezzük. Jelenleg még keveset tudunk ezen vegyületek működéséről, de az egyre növekvő mennyiségű eredmények több diszruptor káros hatására is felhívták a figyelmet. Jelen dolgozatban az egyik képviselőjük, a mostanában kiemelt figyelmet kapott *Fusarium* mikotoxin, a zearalenon hatásait vizsgáltuk *in vitro* körülmények között. A vizsgálat célja, hogy megtudjuk, zearalenonnal való kezelés hatással van-e a fejlődő neurális sejt kultúrák béta ösztrogén receptorainak (ER β), és alfa és béta thyroid receptorainak (TR α és β) expressziójára. Emellett, a 17 β -ösztradiolt és trijód-tironin moduláló hatása is megfigyelésre került.

A vizsgálat során hétnapos, Sprague-Dawley patkány kölykök felhasználásával kisagyi sejteket tartalmazó sejt kultúrát hoztunk létre, majd a kiültetést követő hetedik napon a következő módon kezeltük a sejteket: az egyik felén zearalenont alkalmaztunk, míg a sejt kultúrák másik felét kezeletlenül hagytunk. Egyes kezelt és kezeletlen csoportokhoz 17 β -ösztradiolt, 3,3',5-trijód-L-trionint vagy ezek kombinációját adtuk. Western blot technikával vizsgáltuk a fentebb ismertetett receptorok mennyiségét a sejt kultúrákban.

A zearalenon kezelés minden esetben jelentősen növelte az expresszált receptorfehérjék mennyiségét mind a kontrollhoz, mint pedig a kizárólag hormonokkal kezelt sejt kultúrákhoz viszonyítva. Eredményeink szerint a zearalenon képes a központi idegrendszer fejlődését több úton is befolyásolni, ezzel ez az anyag lehetséges okozója lehet egyes szaporodásbiológiai és fejlődéstani problémáknak az állattartásban.

Irodalomjegyzék

- [1] E. R. Kabir, M. S. Rahman, and I. Rahman, “A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health,” *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 40, no. 1, pp. 241–258, 2015.
- [2] M. J. Rocha, C. Cruzeiro, M. Reis, M. Â. Pardal, and E. Rocha, “Pollution by endocrine disruptors in a southwest European temperate coastal lagoon (Ria de Aveiro, Portugal).,” *Environmental monitoring and assessment*, vol. 188, no. 2, p. 101, Feb. 2016.
- [3] A. Zinedine, J. M. Soriano, J. C. Moltó, and J. Mañes, “Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: an oestrogenic mycotoxin.,” *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, vol. 45, no. 1, pp. 1–18, Jan. 2007.
- [4] H. Tima, A. Brückner, C. Mohácsi-Farkas, and G. Kiskó, “*Fusarium* mycotoxins in cereals harvested from Hungarian fields,” *Food Additives & Contaminants: Part B*, vol. 9, no. 2, pp. 127–131, Apr. 2016.
- [5] L. Escrivá, G. Font, and L. Manyes, “In vivo toxicity studies of fusarium mycotoxins in the last decade: A review,” *Food and Chemical Toxicology*, vol. 78, pp. 185–206, 2015.
- [6] C. Juan, A. Ritieni, and J. Mañes, “Determination of trichothecenes and zearalenones in grain cereal, flour and bread by liquid chromatography tandem mass spectrometry,” *Food Chemistry*, vol. 134, no. 4, pp. 2389–2397, 2012.
- [7] P. M. Scott, “Mycotoxins transmitted into beer from contaminated grains during brewing.,” *Journal of AOAC International*, vol. 79, no. 4, pp. 875–82, 1995.
- [8] T. Kuiper-Goodman, P. M. Scott, and H. Watanabe, “Risk assessment of the mycotoxin zearalenone.,” *Regulatory toxicology and pharmacology : RTP*, vol. 7, no. 3, pp. 253–306, Sep. 1987.

- [9] P. H. Hidy, R. S. Baldwin, R. L. Greasham, C. L. Keith, and J. R. McMullen, "Zearalenone and Some Derivatives: Production and Biological Activities," *Advances in Applied Microbiology*, vol. 22, pp. 59–82, 1977.
- [10] I. Völkel, E. Schröer-Merker, and C.-P. Czerny, "The Carry-Over of Mycotoxins in Products of Animal Origin with Special Regard to Its Implications for the European Food Safety Legislation," *Food and Nutrition Sciences*, vol. 2, no. 8, pp. 852–867, 2011.
- [11] R. Zhu *et al.*, "A simple sample pretreatment method for multi-mycotoxin determination in eggs by liquid chromatography tandem mass spectrometry," *Journal of Chromatography A*, vol. 1417, pp. 1–7, 2015.
- [12] M. Palyusik, B. Harrach, C. J. Mirocha, and S. V Pathre, "Transmission of zearalenone and zearalenol into porcine milk.," *Acta veterinaria Academiae Scientiarum Hungaricae*, vol. 28, no. 2, pp. 217–22, 1980.
- [13] C. Pietsch *et al.*, "Effects of Dietary Exposure to Zearalenone (ZEN) on Carp (*Cyprinus carpio* L.)," *Toxins*, vol. 7, no. 9, pp. 3465–3480, Aug. 2015.
- [14] Z. Yu, L. Zhang, D. Wu, and F. Liu, "Anti-apoptotic action of zearalenone in MCF-7 cells," *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 62, no. 3, pp. 441–446, 2005.
- [15] J. C. Turcotte, P. J. B. Hunt, and J. D. Blaustein, "Estrogenic effects of zearalenone on the expression of progesterin receptors and sexual behavior in female rats," *Hormones and Behavior*, vol. 47, no. 2, pp. 178–184, 2005.
- [16] M. Weidner *et al.*, "Influence of T-2 and HT-2 Toxin on the Blood-Brain Barrier In Vitro: New Experimental Hints for Neurotoxic Effects," *PLoS ONE*, vol. 8, no. 3, p. e60484, Mar. 2013.
- [17] M. Chaudhary and P. V. Lakshmana Rao, "Brain oxidative stress after dermal and subcutaneous exposure of T-2 toxin in mice," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 48, no. 12, pp. 3436–3442, 2010.
- [18] J. Wang, D. . Fitzpatrick, and J. . Wilson, "Effect of T-2 Toxin on Blood–Brain Barrier Permeability Monoamine Oxidase Activity and Protein Synthesis in Rats," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 36, no. 11, pp. 955–961, 1998.

- [19] R. Kriszt *et al.*, “Xenoestrogens Ethinyl Estradiol and Zearalenone Cause Precocious Puberty in Female Rats via Central Kisspeptin Signaling,” *Endocrinology*, vol. 156, no. 11, pp. 3996–4007, Nov. 2015.
- [20] J. A. Carroll, M. A. Walker, S. M. Hartsfield, N. H. McArthur, and T. H. Welsh, “Visual documentation of ovine pituitary gland development with magnetic resonance imaging following zeranol treatment.,” *Laboratory animals*, vol. 41, no. 1, pp. 120–7, Jan. 2007.
- [21] A. Zinedine, J. M. Soriano, J. C. Moltó, and J. Mañes, “Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An oestrogenic mycotoxin,” *Food and Chemical Toxicology*, vol. 45, no. 1, pp. 1–18, 2007.
- [22] I. M. Hueza, P. C. F. Raspantini, L. E. R. Raspantini, A. O. Latorre, and S. L. Górnaiak, “Zearalenone, an estrogenic mycotoxin, is an immunotoxic compound.,” *Toxins*, vol. 6, no. 3, pp. 1080–95, Mar. 2014.
- [23] C. Frizzell *et al.*, “Endocrine disrupting effects of zearalenone, alpha- and beta-zearalenol at the level of nuclear receptor binding and steroidogenesis,” *Toxicology Letters*, vol. 206, no. 2, pp. 210–217, 2011.
- [24] H. Kuhl, “Pharmacology of estrogens and progestogens: influence of different routes of administration,” *Climacteric*, vol. 8, no. sup1, pp. 3–63, Aug. 2005.
- [25] G. G. J. M. Kuiper *et al.*, “Comparison of the Ligand Binding Specificity and Transcript Tissue Distribution of Estrogen Receptors α and β ,” *Endocrinology*, vol. 138, no. 3, pp. 863–870, Mar. 1997.
- [26] L. R. Nelson and S. E. Bulun, “Estrogen production and action,” *Journal of the American Academy of Dermatology*, vol. 45, no. 3, pp. S116–S124, 2001.
- [27] C. Beyer, “Estrogen and the developing mammalian brain.,” *Anatomy and embryology*, vol. 199, no. 5, pp. 379–90, May 1999.
- [28] S. Ray, R. Rastogi, and A. Kumar, “Current status of estrogen receptors,” in *Progress in Drug Research*, Basel: Birkhäuser Basel, 2002, pp. 201–232.

- [29] Z. Weihua, S. Andersson, G. Cheng, E. R. Simpson, M. Warner, and J.-Å. Gustafsson, "Update on estrogen signaling," *FEBS Letters*, vol. 546, no. 1, pp. 17–24, Jul. 2003.
- [30] E. D. Lephart, "A review of brain aromatase cytochrome P450," *Brain Research Reviews*, vol. 22, no. 1, pp. 1–26, 1996.
- [31] N. J. MacLusky, I. Lieberburg, and B. S. McEwen, "The development of estrogen receptor systems in the rat brain: Perinatal development," 1979.
- [32] P. Vrtačnik, B. Ostanek, S. Mencej-Bedrač, and J. Marc, "The many faces of estrogen signaling," *Biochemia medica*, vol. 24, no. 3, pp. 329–42, 2014.
- [33] S. M. Belcher, "Rapid signaling mechanisms of estrogens in the developing cerebellum," *Brain Research Reviews*, vol. 57, no. 2, pp. 481–492, 2008.
- [34] B. McEwen, "Estrogen actions throughout the brain," *Recent progress in hormone research*, 2002.
- [35] P. M. Yen, "Physiological and Molecular Basis of Thyroid Hormone Action," *Physiological Reviews*, vol. 81, no. 3, 2001.
- [36] L. C. Faustino and T. M. Ortiga-Carvalho, "Thyroid hormone role on cerebellar development and maintenance: a perspective based on transgenic mouse models.," *Frontiers in endocrinology*, vol. 5, p. 75, 2014.
- [37] N. Koibuchi and W. W. Chin, "Thyroid Hormone Action and Brain Development," *Trends in Endocrinology & Metabolism*, vol. 11, no. 4, pp. 123–128, 2000.
- [38] J. W. Smith, A. T. Evans, B. Costall, and J. W. Smythe, "Thyroid hormones, brain function and cognition: a brief review," *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, vol. 26, no. 1, pp. 45–60, 2002.
- [39] F. H. Epstein and G. A. Brent, "The Molecular Basis of Thyroid Hormone Action," *New England Journal of Medicine*, vol. 331, no. 13, pp. 847–853, Sep. 1994.
- [40] Y. Wu and R. J. Koenig, "Gene Regulation by Thyroid Hormone," *Trends in Endocrinology & Metabolism*, vol. 11, no. 6, pp. 207–211, 2000.
- [41] D. Forrest, M. Sjöberg, and B. Vennström, "Contrasting developmental and tissue-specific expression of alpha and beta thyroid hormone receptor genes.," *The EMBO journal*, vol. 9, no. 5, pp. 1519–28, May 1990.

- [42] O. M. Ahmed, R. G. Ahmed, A. W. El-Gareib, A. M. El-Bakry, and S. M. Abd El-Tawab, "Effects of experimentally induced maternal hypothyroidism and hyperthyroidism on the development of rat offspring: II—The developmental pattern of neurons in relation to oxidative stress and antioxidant defense system," *International Journal of Developmental Neuroscience*, vol. 30, no. 6, pp. 517–537, 2012.
- [43] G. M. Shepherd, *The synaptic organization of the brain*. New York: Oxford University Press, 2004.
- [44] M. E. Hatten and N. Heintz, "Mechanisms of neural patterning and specification in the developing cerebellum.," *Annual review of neuroscience*, vol. 18, pp. 385–408, 1995.
- [45] R. L. Jakab, J. K. Wong, and S. M. Belcher, "Estrogen receptor immunoreactivity in differentiating cells of the developing rat cerebellum," *The Journal of Comparative Neurology*, vol. 430, no. 3, pp. 396–409, Feb. 2001.
- [46] T. Scalise *et al.*, "Ligand-induced changes in Oestrogen and thyroid hormone receptor expression in the developing rat cerebellum: A comparative quantitative PCR and Western blot study," *Acta Veterinaria Hungarica*, vol. 60, no. 2, pp. 263–284, Jun. 2012.
- [47] Z. Vlata, F. Porichis, G. Tzanakakis, A. Tsatsakis, and E. Krambovitis, "A study of zearalenone cytotoxicity on human peripheral blood mononuclear cells," *Toxicology Letters*, vol. 165, no. 3, pp. 274–281, 2006.
- [48] S. Abid-Essefi, Z. Ouanes, W. Hassen, I. Baudrimont, E. Creppy, and H. Bacha, "Cytotoxicity, inhibition of DNA and protein syntheses and oxidative damage in cultured cells exposed to zearalenone," *Toxicology in Vitro*, vol. 18, no. 4, pp. 467–474, 2004.
- [49] W. Hassen, I. Ayed-Boussema, A. A. Oscoz, A. De Cerain Lopez, and H. Bacha, "The role of oxidative stress in zearalenone-mediated toxicity in Hep G2 cells: Oxidative DNA damage, glutathione depletion and stress proteins induction," *Toxicology*, vol. 232, no. 3, pp. 294–302, 2007.

- [50] G. C. Pistol *et al.*, “Natural feed contaminant zearalenone decreases the expressions of important pro- and anti-inflammatory mediators and mitogen-activated protein kinase/NF- κ B signalling molecules in pigs,” *British Journal of Nutrition*, vol. 111, no. 3, pp. 452–464, Feb. 2014.
- [51] Z. Jia *et al.*, “Modified halloysite nanotubes and the alleviation of kidney damage induced by dietary zearalenone in swine,” *Food Additives & Contaminants: Part A*, vol. 32, no. 8, pp. 1312–1321, Aug. 2015.
- [52] M. Denli, J. C. Blandon, M. E. Guynot, S. Salado, and J. F. Pérez, “Efficacy of activated diatomaceous clay in reducing the toxicity of zearalenone in rats and piglets,” *Journal of Animal Science*, vol. 93, no. 2, p. 637, 2015.
- [53] F. Massart and G. Saggese, “Oestrogenic mycotoxin exposures and precocious pubertal development,” *International Journal of Andrology*, vol. 33, no. 2, pp. 369–376, Apr. 2010.
- [54] D. Mukherjee *et al.*, “Physiologically-Based Toxicokinetic Modeling of Zearalenone and Its Metabolites: Application to the Jersey Girl Study,” *PLoS ONE*, vol. 9, no. 12, p. e113632, Dec. 2014.
- [55] G. Jocsak *et al.*, “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,” *International Journal of Environmental Research and Public Health*, vol. 13, no. 6, p. 619, Jun. 2016.
- [56] O. M. Ahmed, A. W. El-Gareib, A. M. El-bakry, S. M. Abd El-Tawab, and R. G. Ahmed, “Thyroid hormones states and brain development interactions,” *International Journal of Developmental Neuroscience*, vol. 26, no. 2, pp. 147–209, 2008.
- [57] N. Koibuchi, “Thyroid hormone action in developing brain and its modulation by polyhalogenated aromatic hydrocarbons,” *International Congress Series*, vol. 1287, pp. 190–194, 2006.
- [58] S. K. Varma and J. D. Crawford, “Long-Term Perspectives of Thyroxine Administration in Neonatal Rats,” *Hormone Research*, vol. 10, no. 6, pp. 327–335, 1979.

- [59] E. Adibnia, M. Razi, and H. Malekinejad, "Zearalenone and 17 β -estradiol induced damages in male rats reproduction potential; evidence for ER α and ER β receptors expression and steroidogenesis," *Toxicol*, vol. 120, pp. 133–146, 2016.
- [60] L. Wang, S. Andersson, M. Warner, and J.-A. Gustafsson, "Estrogen receptor (ER)beta knockout mice reveal a role for ERbeta in migration of cortical neurons in the developing brain.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 100, no. 2, pp. 703–8, Jan. 2003.
- [61] R. M. Martin *et al.*, "Familial Hyperestrogenism in Both Sexes: Clinical, Hormonal, and Molecular Studies of Two Siblings," *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, vol. 88, no. 7, pp. 3027–3034, Jul. 2003.
- [62] F. M. Bristol and S. Djurickovic, "Hyperestrogenism in female swine as the result of feeding mouldy corn.," *The Canadian veterinary journal = La revue veterinaire canadienne*, vol. 12, no. 6, pp. 132–5, Jun. 1971.
- [63] G. A. Weaver *et al.*, "Mycotoxin-induced abortions in swine.," *The Canadian veterinary journal = La revue veterinaire canadienne*, vol. 19, no. 3, pp. 72–4, Mar. 1978.
- [64] E. A. Jannini, S. Dolci, S. Ulisse, and V. M. Nikodem, "Developmental regulation of the thyroid hormone receptor alpha 1 mRNA expression in the rat testis.," *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, vol. 8, no. 1, pp. 89–96, Jan. 1994.
- [65] S. Jeong and J. Cho, "Thyroid Hormones Receptor/Reporter Gene Transcription Assay for Food Additives and Contaminants," *Toxicological Research*, 2005.
- [66] S. Rajoria *et al.*, "Estrogen activity as a preventive and therapeutic target in thyroid cancer," *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 66, no. 2, pp. 151–158, Mar. 2012.
- [67] H. Masuyama, H. Inoshita, Y. Hiramatsu, and T. Kudo, "Ligands Have Various Potential Effects on the Degradation of Pregnane X Receptor by Proteasome," *Endocrinology*, vol. 143, no. 1, pp. 55–61, Jan. 2002.
- [68] J. L. Nicholson and J. Altman, "The effects of early hypo- and hyperthyroidism on the development of rat cerebellar cortex. I. Cell proliferation and differentiation," *Brain Research*, vol. 44, no. 1, pp. 13–23, 1972.

- [69] B. M. Fadel, S. Ellahham, J. Lindsay, M. D. Ringel, L. Wartofsky, and K. D. Burman, "Hyperthyroid heart disease," *Clinical Cardiology*, vol. 23, no. 6, pp. 402–408, Jun. 2000.
- [70] R. A. Cohen and R. W. Gerard, "Hyperthyroidism and brain oxidations," *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, vol. 10, no. 2, pp. 223–240, Aug. 1937.
- [71] P. Venditti and S. Di Meo, "Thyroid hormone-induced oxidative stress," *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 63, no. 4, pp. 414–434, Feb. 2006.
- [72] G. Tapia, V. Fernández, P. Varela, P. Cornejo, J. Guerrero, and L. A. Videla, "Thyroid hormone-induced oxidative stress triggers nuclear factor- κ B activation and cytokine gene expression in rat liver," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 35, no. 3, pp. 257–265, 2003.
- [73] I. J. CHOPRA and D. TULCHINSKY, "Status of Estrogen-Androgen Balance in Hyperthyroid Men with Graves' Disease," *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, vol. 38, no. 2, pp. 269–277, Feb. 1974.
- [74] F. Chen, R. W. Figliozzi, G. Bedadala, J. Palem, and S. V. Hsia, "Overexpression of thyroid hormone receptor β 1 altered thyroid hormone-mediated regulation of herpes simplex virus-1 replication in differentiated cells.," *Journal of neurovirology*, vol. 22, no. 5, pp. 555–563, Oct. 2016.
- [75] R. A. Hodin, M. A. Lazar, and W. W. Chin, "Differential and tissue-specific regulation of the multiple rat c-erbA messenger RNA species by thyroid hormone.," *The Journal of clinical investigation*, vol. 85, no. 1, pp. 101–5, Jan. 1990.
- [76] K. A. Faber and C. L. Hughes, "The effect of neonatal exposure to diethylstilbestrol, genistein, and zearalenone on pituitary responsiveness and sexually dimorphic nucleus volume in the castrated adult rat.," *Biology of reproduction*, vol. 45, no. 4, pp. 649–53, Oct. 1991.

Köszönetnyilvánítás

Köszönetet szeretnék mondani elsősorban témavezetőmnek, Jócsák Gergelynek és Dr. Kiss Dávid Sándornak, akik munkámat mind a kutatás során, mind jelen dokumentum elkészítése alatt szívesen segítette.

Ezen kívül köszönöm Kinálné Szikora Zsuzsannának, hogy segítette elsajátítani a kísérlethez szükséges metodikákat, megosztotta velem az anyagismerettel kapcsolatos tudását és, hogy mindig kész volt segítséget nyújtani nekem. Köszönöm Goszleth Grétának a Western blot kísérletekben nyújtott segítségét.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Bartha Tibornak, az Élettani és Biokémiai Tanszék vezetőjének, aki biztosította a feltételeket a kísérleteinkhez.

Köszönet illeti az Élettani és Biokémiai Tanszéket, amiért a dolgozatomat a Tanszéken végezhettem el.

Szeretném megköszönni Prof. Dr. Reiczigel Jenőnek, a Biomatematikai és Számítástechnikai Tanszék vezetőjének, hogy a tanszék elvégezte ezen dolgozat elkészültéhez feltétlenül szükséges adatelemzéseket.

Végezetül, hálás vagyok mindenkinek, aki támogatta a munkámat, és hozzájárult a kutatás megszületéséhez és sikeréhez.

NYILATKOZAT

Alulírott BAGÓ BALINT..... nyilatkozom, hogy szakdolgozatom,

melynek címe Egy újabb antibiotikum, a zoroallan batosa fejlődés

gyógyi és farmakológiai és farmakológiai és farmakológiai
expériences

tartalmi és formai szempontból teljes mértékben megegyezik azonos című, a ...2017.....

évi TDK konferencián szerepelt dolgozatommal.

Budapest, 2017. 11. 22.....

BAGÓ BALINT.....

a hallgató neve és aláírása

Alulírott JÓCSAK GERGE.....


Igazolom, hogy

BAGC BALINT

..... (a hallgató neve)

Egy írást ~~írtam~~ ~~írtam~~ ~~írtam~~, a rendelkezésedre bocsátom. Ezzel egyidejűleg
bírálatod és pozícióértékelésedre kérek. A rendelkezésedre bocsátom a "Azt, amit
látok, és azt, amit nem látok" című szakdolgozatát ismerem, azt beadásra és védésre alkalmasnak tartom.

Budapest, 2017. 11. 22.

Jócsák Gérgy 

.....
a témavezető neve és aláírása

Élettani és Biokémiai tanszék

.....
tanszék

HuVetA
ELHELYEZÉSI MEGÁLLAPODÁS ÉS SZERZŐI JOGI NYILATKOZAT*

Név: BAGÓ BALINT
Elérhetőség (e-mail cím): b.balint.1231@gmail.hu
A feltöltendő mű címe: Egy új metatags és szerkesztési szabvány bevezetése
... és a hozzájárulás biztosításának érdekében
A mű megjelenési adatai: SZAKDOLGOZAT
Az átadott fájlok száma: 1

Jelen megállapodás elfogadásával a szerző, illetve a szerzői jogok tulajdonosa nem kizárólagos jogot biztosít a HuVetA számára, hogy archiválja (a tartalom megváltoztatása nélkül), a megőrzés és a hozzáférhetőség biztosításának érdekében) és másolásvédett PDF formára konvertálja és szolgáltassa a fenti dokumentumot (beleértve annak kivonatát is).

Beleegyeznek, hogy a HuVetA egynél több (csak a HuVetA adminisztrátorai számára hozzáférhető) másolatot tároljon az Ön által átadott dokumentumból kizárólag biztonsági, visszaállítási és megőrzési célból.

Kijelenti, hogy az átadott dokumentum az Ön műve, és/vagy jogosult biztosítani a megállapodásban foglalt rendelkezéseket arra vonatkozóan. Kijelenti továbbá, hogy a mű eredeti és legjobb tudomása szerint nem sérti vele senki más szerzői jogát. Amennyiben a mű tartalmaz olyan anyagot, melyre nézve nem Ön birtokolja a szerzői jogokat, fel kell tüntetnie, hogy korlátlan engedélyt kapott a szerzői jog tulajdonosától arra, hogy engedélyezhesse a jelen megállapodásban szereplő jogokat, és a harmadik személy által birtokolt anyagrész mellett egyértelműen fel van tüntetve az eredeti szerző neve a művön belül.

A szerzői jogok tulajdonosa a hozzáférés körét az alábbiakban határozza meg (**egyetlen, a megfelelő négyzetben elhelyezett x jellel**):

- engedélyezi, hogy a HuVetA-ban -ban tárolt művek korlátlanul hozzáférhetővé váljanak a világhálón,
- az Állatorvostudományi Egyetem belső hálózatára (IP címekre) korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,
- a Könyvtárban található, dedikált elérést biztosító számítógépre korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,
- csak a dokumentum bibliográfiai adatainak és tartalmi kivonatának feltöltéséhez járul hozzá (korlátlan hozzáféréssel),

Kérjük, nyilatkozzon a négyzetben elhelyezett jellel a helyben használatról is:



Engedélyezem a dokumentum(ok) nyomtatott változatának helyben olvasását a könyvtárban.

Amennyiben a feltöltés alapját olyan mű képezi, melyet valamely cég vagy szervezet támogatott illetve szponzorált, kijelenti, hogy jogosult egyetérteni jelen megállapodással a műre vonatkozóan.

A HuVetA üzemeltetői a szerző, illetve a jogokat gyakorló személyek és szervezetek irányában nem vállalnak semmilyen felelősséget annak jogi orvoslására, ha valamely felhasználó a HuVetA-ban engedéllyel elhelyezett anyaggal törvénysértő módon visszaélne.

Budapest, 2017. év17.....hó ...2...2...nap



aláírás

szerző/a szerzői jog tulajdonosa

A HuVetAMagyar Állatorvos-tudományi Archívum – Hungarian Veterinary Archive az Állatorvostudományi Egyetem Hutýra Ferenc Könyvtár, Levéltár és Múzeum által működtetett egyetemi és szakterületi online adattár, melynek célja, hogy a magyar állatorvos-tudomány és -történet dokumentumait, tudásvagyont elektronikus formában összegyűjtse, rendszerezze, megőrizze, kereshetővé és hozzáférhetővé tegye, szolgáltassa, a hatályos jogi szabályozások figyelembe vételével.

A HuVetA a korszerű informatikai lehetőségek felhasználásával biztosítja a könnyű, (internetes keresőgépekkel is működő) kereshetőséget és lehetőség szerint a teljes szöveg azonnali elérését. Célja ezek révén

- a magyar állatorvos-tudomány hazai és nemzetközi ismertségének növelése;
- a magyar állatorvosok publikációira történő hivatkozások számának, és ezen keresztül a hazai állatorvosi folyóiratok impact faktorának növelése;
- az Állatorvostudományi Egyetem és az együttműködő partnerek tudásvagyónának koncentrált megjelenítése révén az intézmények és a hazai állatorvos-tudomány tekintélyének és versenyképességének növelése;
- a szakmai kapcsolatok és együttműködés elősegítése,
- a nyílt hozzáférés támogatása.