

Állatorvostudományi Egyetem



Élettani és Biokémiai Tanszék

**Elektronmikroszkóppal detektálható morfológiai változások a hypothalamicus mitokondriumokban, As, ZEA és BPA endokrin diszruptorok hatására**

Készítette:

Valkovszki Vivien

Témavezetők:

Dr. Kiss Dávid Sándor, egyetemi docens, ÁTE, Élettani és Biokémiai Tanszék  
Prof. Dr. Zsarnovszky Attila, egyetemi tanár, külső tudományos munkatárs, MATE,  
Élettani és Állategészségügyi Tanszék

Budapest, 2022

## TARTALOMJEGYZÉK

<b>1</b>	<b>RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....</b>	<b>2</b>
<b>2</b>	<b>IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....</b>	<b>3</b>
2.1	ENDOKRIN DISZRUPTOROK.....	3
2.1.1	<i>Biszfenol A</i> .....	4
2.1.2	<i>Zearalenon</i> .....	5
2.1.3	<i>Arzén</i> .....	6
2.2	HYPOTHALAMICUS MELANOCORTIN RENDSZER.....	7
2.3	MITOKONDRIMUM MORFOLÓGIA.....	9
<b>3</b>	<b>CÉLKITŰZÉSEK.....</b>	<b>11</b>
<b>4</b>	<b>ANYAG ÉS MÓDSZER.....</b>	<b>12</b>
4.1	HELYSZÍN ÉS KÍSÉRLETI ÁLLATOK.....	12
4.2	KÍSÉRLETI ELRENDEZÉS.....	12
4.3	MINTAVÉTEL.....	12
4.4	METSZETKÉSZÍTÉS.....	14
4.5	IMMUNHISZTOKÉMIA.....	14
4.6	BEÁGYAZÁS ÉS ULTRAMETSZÉS.....	15
4.7	ELEKTRONMIKROSKÓPIA.....	15
4.8	MORFOLÓGIAI ELEMZÉS.....	16
<b>5</b>	<b>EREDMÉNYEK.....</b>	<b>18</b>
5.1	MITOKONDRIMUMOK ÁTLAGMÉRETE.....	18
5.2	MITOKONDRIMUMOK SZÁMA.....	19
5.3	CRISTÁK.....	21
5.4	MITOKONDRIMUM-ENDOPLAZMATIKUS RETIKULUM KAPCSOLAT.....	23
5.5	TOVÁBBI MEGFIGYELÉSEK.....	25
<b>6</b>	<b>MEGBESZÉLÉS.....</b>	<b>26</b>
6.1	MITOKONDRIMUMOK ÁTLAGMÉRETE.....	26
6.2	MITOKONDRIMUMOK SZÁMA.....	26
6.3	CRISTÁK.....	27
6.4	MITOKONDRIMUM-ENDOPLAZMATIKUS RETIKULUM KAPCSOLAT.....	27
6.5	KÖVETKEZTETÉSEK.....	28
<b>7</b>	<b>ÖSSZEFOGLALÓ.....</b>	<b>30</b>
<b>8</b>	<b>SUMMARY.....</b>	<b>31</b>
<b>9</b>	<b>IRODALOMJEGYZÉK.....</b>	<b>32</b>
<b>10</b>	<b>KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....</b>	<b>37</b>

# 1 Rövidítések jegyzéke

ACTH:	adrenocorticotrop hormon
AgRP:	agouti-kapcsolt fehérje szintetizáló sejtek
ARC:	nucleus arcuatus
As:	arzén
BPA:	biszfenol A
DMSO:	dimetil-szulfoxid
ED:	endokrin diszruptor
EndoR:	endoplazmatikus retikulum
ER:	ösztrogénreceptor
GABA:	gamma-aminovajsav
KIR:	központi idegrendszer
MCR:	melanocortin-receptor
MSH:	melanocitastimuláló hormon
NPY:	neuropeptid Y
NR:	magreceptor
PB:	foszfátpuffer
POMC:	proopiomelanocortin
PPAR $\gamma$ :	peroxiszóma proliferátor által aktivált receptor-gamma
ROS:	reaktív oxigéngyök
TEM:	transzmissziós elektronmikroszkóp
TR:	pajzsmirigyhormon-receptor
ZEA:	zearalenon

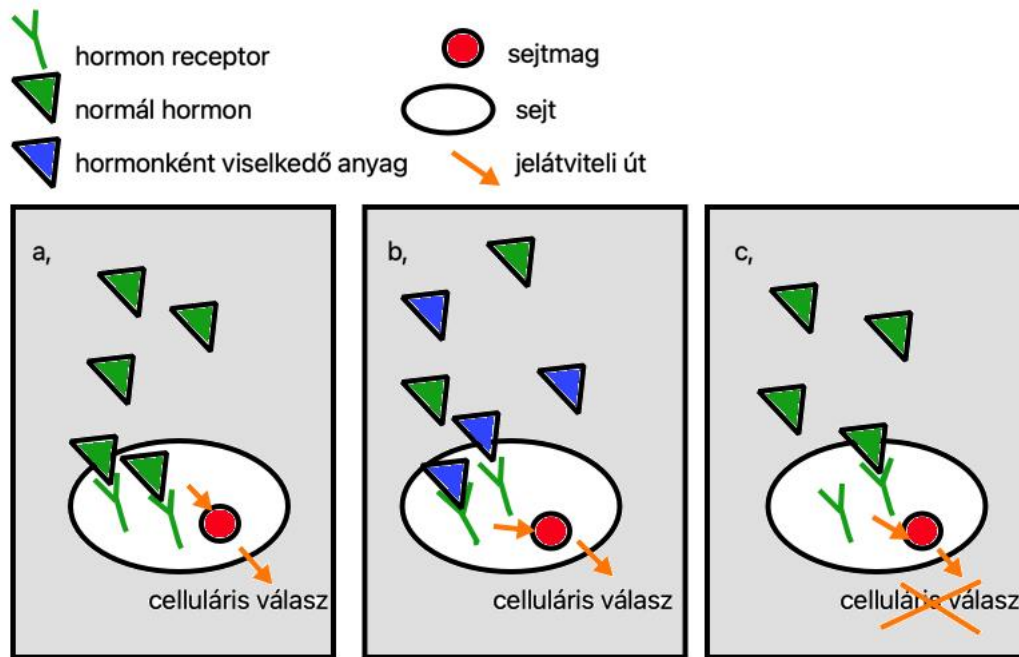
## 2 Irodalmi áttekintés

### 2.1 Endokrin diszruptorok

A mai világ részévé vált a mindennapos károsanyag kibocsátás, melynek így az élőlények nap mint nap ki vannak téve. Ennek megakadályozása, illetve visszafordítása érdekében elengedhetetlen ezeknek a mérgező anyagoknak a vizsgálata, kimutatása, semlegesítése és a kibocsátás csökkentése, annak érdekében, hogy megelőzzük azok káros hatásainak manifesztálódását. Ilyen anyagnak számítanak többek között az endokrin diszruptorok (ED) is. Az EDk számos definíciója ismert az elmúlt években, de összességében olyan természetben elsősorban növényekben (fitoösztrogének, genistein, kumestrol) [1] mesterségesen környezeti vegyszerekben (peszticidek, ipari melléktermékek, feldolgozó ipari termékek – elsősorban műanyag [2, 3]) található kémiai anyagok, amelyek agonista/antagonista hatást gyakorolnak a hormonrendszerre, a normál endokrin működésre, így befolyásolva az élőlények egészségi és reprodukciós állapotát [4].

Napjainkban számos kutatás foglalkozik elsősorban a mesterséges EDk mechanizmusának vizsgálatával, azok hatásainak megállapításával. Ezek a kémiai anyagok hatással vannak egyes hormonok metabolizmusára, szintézisére, felszabadulására, eliminációjára, továbbá maguk is képesek bizonyos hormonokként viselkedni, azokkal megegyező vagy éppen azokéval ellentétes hatást kiváltani a szervezetben [5] (*1. ábra*). Az ED hatások olyan élettani folyamatokat zavarnak meg, módosítanak, vagy gátolnak, mint a nemi fejlődés, szexuális viselkedés, reprodukció, inzulin háztartás szabályozása, növekedés, stressztűrés, illetve metabolikus ráta. Különösen fontos megemlíteni, hogy ezek a kémiai anyagok már kis mennyiségben képesek komoly hatást kiváltani a szervezetben – a sejteken található receptorokat fel- vagy leszabályozzák, így az élettaninál erősebb vagy gyengébb választ generálva [6].

Meghatározó továbbá az is, hogy az élet mely szakaszában és milyen hosszú ideig van kitéve az állat vagy ember az adott ED-nak. A magzati, illetve az újszülött élet során már minimális mennyiségű ED is kihathat a fejlődésre, ideértve bizonyos agyi funkciókat, a szervek fiziológiás formáját vagy az immunrendszert. Ezek a tényezők a későbbi élet során komoly betegségek, rendellenességek alapjai lehetnek (pl. elhízás, rák), befolyásolhatják az életminőséget és a normális egyedfejlődést [7, 8].



1. ábra: EDk működési elvének sematikus ábrázolása: a) A normál hormon szintet növelni, illetve csökkenteni képes, b) hormonként képes viselkedni, c) a hormonok természetes mechanizmusát befolyásolja. Tabb és Blumber (2006) alapján.

Az EDk pontos mechanizmusa még nem ismert, továbbá az egyes anyagok igen különbözőek egymástól, mind struktúrában, mind természetükben [9], így általános következtetést egy hatóanyag alapján nem vonhatunk le minden ED-ra. Szöveti szinten már tisztázott a magreceptorok (NR), ösztrogénreceptorok (ER), pajzsmirigyhormon-receptorok (TR) és peroxiszóma proliferátor által aktivált gamma receptorok (PPAR $\gamma$ ) fontossága az EDk hatásmechanizmusában [10], az okozott celluláris elváltozások azonban még kétségesek. Többek között direkt hatást fejthetnek ki sejtszinten a mitokondriumok metabolikus funkciójára; ezt célozva számos kutatás vizsgálta a biszfenol A (BPA), zearalenon (ZEA) és arzén (As) celluláris hatását sejtenyészeten, illetve kísérleti állatokban. Így figyelték meg többek között a megnövekedett mennyiségű reaktív oxigéngyök (ROS) termelődését, oxidatív stressznek kitett mitokondriumokat és endoplazmatikus retikulumot (EndoR). Továbbá, kimutattak mitokondriális DNS károsodást, a mitokondrium membránpotenciáljának csökkenését és különböző apoptotikus utak aktiválódását is [11–13]. Morfológia tekintetben azonban hiányoznak lényegi kutatások.

### 2.1.1 Biszfenol A

A biszfenol A az egyik legnagyobb mennyiségben termelt kémiai anyag világszerte [14], mivel nélkülözhetetlen az ütésálló polisztirol, a poliamid, a polivinil-klorid, illetve a polikarbonát műanyag gyártásához, amiből például cumisüvegek, többször használatos palackok, ételhordozók, építési anyagok (ablakkeret, padló burkolat) készülnek. A fém

dobozok belső felszínét borító epoxigyanta szintéziséhez ugyancsak szükséges a BPA. Utóbbi esetben számos tanulmány mutatta ki inkomplett polimerizáció lezajlását, mely miatt a BPA kiválik a gyantából és az élelmiszerbe kerülhet, ez megtörténhet a gyártás során, vagy háztartásban hő, savas, illetve bázikus oldatok hatására. Széleskörű felhasználása miatt a leginkább tanulmányozott ED-rá vált az elmúlt 20 évben. Kimutatták már talajból, természetes vizekből, szennyvízből és levegőből is [15].

A BPA hatása az ERkon keresztül érvényesül, az alfa és béta receptorokhoz egyaránt nagy az affinitása, de az ösztradiolénál kisebb [16]. Emiatt sokáig nem nyilvánítottak neki komolyabb károsító hatást, azonban kutatások bizonyították, hogy számos molekuláris mechanizmuson keresztül képes stimulálni a celluláris választ már alacsony dózisban is [17].

Számos rendellenesség kapcsolható a BPA endokrinológiai hatásaihoz, az érintettek különböző testfolyadékai (vér, magzatvíz, anyatej, vizelet, ondó, folliculáris folyadék) mérhető mennyiségben tartalmazhatják a BPA-t ekkor. Ilyen állapotok többek között a kóros elhízás, policisztás petefészek szindróma (PCOS), vemhességi rendellenességek, rák [15], 2-es típusú diabetes, pajzsmirigy működési problémák [18].

### 2.1.2 Zearalenon

A zearalenon, vagy F-2 toxin, egy gomba mikotoxin, melyet a *Fusarium* genus tagjai szintetizálnak [19]. Széleskörben előfordul az emberi fogyasztásra szánt gabonatermékekben, melyek közül leginkább a kukorica érintett, de a gombatoxinnal érintkező vizek is potenciális veszélyforrások [20]. A *Fusarium* gombák már a termőföldön megfertőzhetik a növényeket, de gyakran a tárolás, illetve feldolgozás során történik ez meg [21]. Amennyiben nem történik meg a gomba, illetve a mikotoxin kimutatása és semlegesítése megfelelő időben, az az élelmiszerlánc egészét érintő folyamatba torkollhat. A ZEA bejuthat olyan általános gabonatermékektől kezdve, mint a reggelizőpehely, a toxinnak kitett állatok húsán, tején át, a bor, sör, szárított gyümölcsökig és fűszerekig, minden feldolgozott élelmiszerbe [22].

A ZEA elsődleges támadási pontja a reprodukív szervrendszer, strukturálisan ugyanis mind a mikotoxin, mind annak metabolitjai nagyon hasonlóak az ösztrogén hormonokhoz (ösztradiol, ösztron, ösztriol). Az ER-alfa és ER-béta receptorokhoz való kapcsolódása a BPA-hoz hasonló módon zajlik le, hatása függ a mennyiségtől és a sejttípustól, melyen kötődött az adott receptorhoz. Ugyanakkor a ZEA esetében fontos kiemelni, hogy metabolitjai, elsősorban az alfa-ZEA, nagy toxicitással rendelkeznek, százszor erősebb ösztrogénszerű hatása van, mint az eredeti molekulának [23]. Felvétel után a ZEA nagyon gyorsan metabolizálódik a vékonybelekben és a májban, erősen kötődik a szervezet szöveteihez, a felesleg pedig

kiválasztódik a vizelettel és az epével, így innen kimutatható a mikotoxinnal való fertőzöttség [19].

A ZEA hatása igen széleskörű, a farmállatok között a sertés a legérzékenyebb, ugyanakkor a veszélynek leginkább kitett állat is. A reproduktív szervrendszert károsító hatások között beszélhetünk a nemi utak elváltozásairól (uterusmegnagyobbodás), fertilitásról, magzatkárosításról. Emberekben a DNS károsítás miatt összefüggésbe hozták különböző daganatos megbetegedésekkel is (endometriális adenocarcinoma) [21], továbbá bizonyítottan kihat a központi idegrendszer (KIR) [24], az immunrendszer, a csontok, a máj és a vesék élettani működésére is [25].

### 2.1.3 Arzén

Az arzén egy olyan félfém, mely a természetben szinte mindenhol fellelhető, ugyanakkor közegészségügyi veszélyt jelent. A földkéregben és az alapkőzetekben halmozódott fel nagy mennyiségben, innen juthat be természetes és mesterséges vizeinkbe [26], a levegőbe, állatokba és növényekbe, valamint élelmiszerinkbe [27]. Elemi állapotban nem toxikus, azonban oxigénnel reagálva olyan vegyületek jönnek létre, melyek súlyos mérgezést okoznak [28]. Szervetlen formában fordul elő nagyobb mennyiségben, ebben a formában toxikusabb, mint a legtöbb szerves vegyülete, kivételt képeznek ez alól a három vegyértékű arzénsavak, amik a szervezetből lassabban ürülnek és így toxikusabbak is. Szervetlen formában beszélhetünk a háromvegyértékű arzenitről, illetve az öt vegyértékű arzenátról, utóbbi kevésbé toxikus [27].

Az As természetes kimosódásán túl komoly problémát jelent az emberi tevékenység okozta szennyezés. A legfontosabb ezek közül a fémbányászat és a fémkohászat, de a szénbányászat és bizonyos fosszilis tüzelőanyagok égetése, a mezőgazdaságban használt peszticidek, faanyagvédőszerek használata szintén komoly szennyezést jelent [29].

A szervezetbe jutva az As vegyületei könnyen felszívódnak és eljutnak a különböző szövetfeleségekbe. Többek között a bélben, májban koncentrálnak, de jelentős mennyiség mérhető a csontokban, szaruképletekben és a bőrben is [27].

Az As ED hatását több receptoron keresztül fejtí ki, kis mennyiségben hormon dependens géntranszkripciót indít, nagyobb, de nem citotoxikus dózisban szupresszálja azt. Az érintett szteroid receptorok a glükokortikoid, mineralokortikoid, progeszteron és androgén receptorok. Az ERkon keresztül szintén képes génmódosítást végrehajtani kis dózisban, azonban a hatásmechanizmus itt több ponton is különbözik a másik négy receptortól. Ebből következően az As számára nem a receptorok jelentik valószínűleg a célpontot, hanem egy olyan fehérje vagy szabályozó útvonal, mely hasonlóan jelen van mindegyiknél [30]. Az arzént karcinogénként tartják számon, számos szervrendszer daganatos elváltozását idézheti elő,

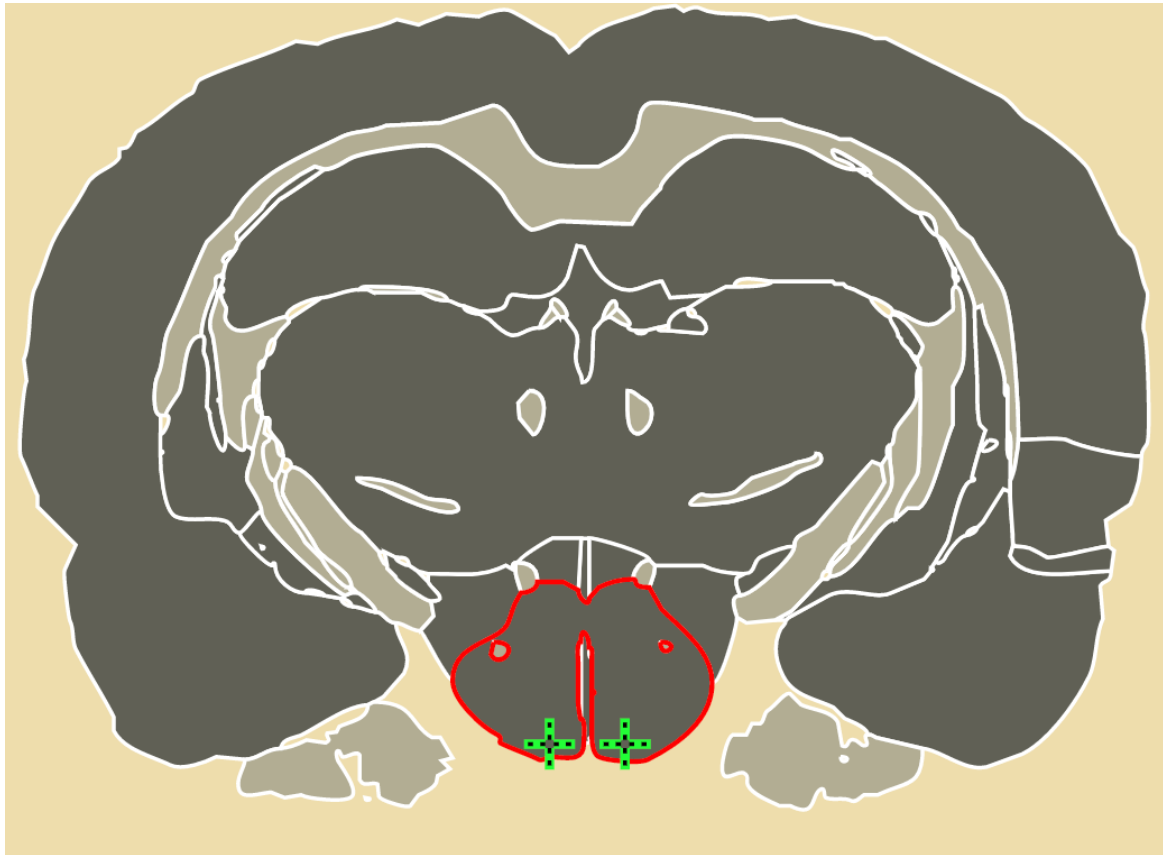
többek között tüdőrákot, bőr-, húgyhólyag-, prosztatata- és májdaganatot is okozhat [31]. A keringési szervrendszert érintő megbetegedések közül a magas vérnyomás, agyvérzés, szívelégtelenség egyik kiváltó tényezője lehet [32], továbbá mellékvese és pajzsmirigy funkciókat érintő elváltozások is köthetők hozzá [33].

## 2.2 Hypothalamicus melanocortin rendszer

A hypothalamus a diencephalon részét képező, elsődleges információszelektáló terület, ennek okán komplex anatómiával rendelkezik és bármilyen sérülése komoly következményekhez vezet [34].

Funkcióját tekintve az egyik legjelentősebb magcsoport, a *nucleus arcuatus* (ARC) [35] a hypothalamus mediobasalis részén, a harmadik kamra és *eminentia mediana* szomszédságában helyezkedik el (2. ábra). Mivel ezen a területen a vér-agy gát módosult [36, 37], így a különböző tápanyagok, hormonok és egyéb molekulák könnyen átjutnak a vérből, ezáltal a perifériáról érkező információk elsődleges szenzoraként hivatkozhatunk az ARC-ra. A különböző információk ezen a területen integrálódnak és szelektálódnak, az egyes neuroncsoportoknak feladata ezek kiválogatása, továbbítása. Az ARC számos neuronjának köszönhetően alapvető a homeosztázis fenntartásában, a metabolizmus és a táplálkozás központja, részt vesz a szexuális viselkedés kialakításában, továbbá a keringési rendszer megfelelő működésében [38].





2. ábra: A nucleus arcuatus elhelyezkedése patkány agyának sematikus ábrázolásán (zöld kereszt) a hypothalamuson (piros keret) belül, coronalis metszetben. Az ábra a Scalable Brain Atlas alkalmazás segítségével készült (<https://scalablebrainatlas.incf.org/rat/PLCJB14>).

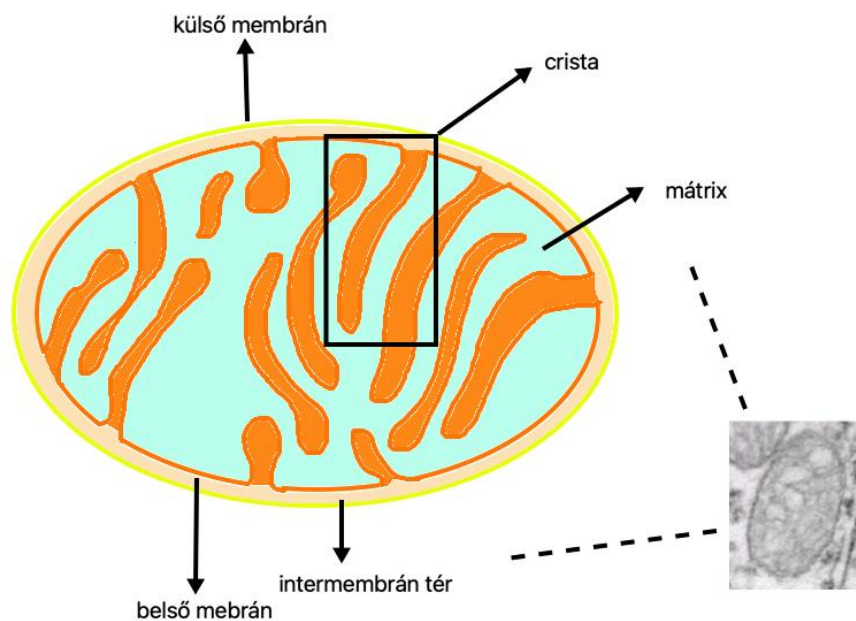
Az ARC területén számos neurokémiailag jól elkülöníthető, eltérő funkciójú neuronpopuláció található, ezek közé tartozik a két, a melanocortin rendszert alkotó sejtpopuláció. A proopiomelanocortint szintetizáló anorexigén (táplálékfelvételt gátló) neuronok csoportját nevezzük röviden POMC-sejteknek. Ezek a neuronok a melanocortin-receptorok (MCR) agonistái, a táplálékfelvételt gátló, valamint az energiafelhasználást növelő jeleket továbbítanak a központi idegrendszer felé, továbbá számos hormon termelését és leadását szabályozzák, mint például az ACTH (adrenocorticotrop hormon) és alfa-MSH (melanocitastimuláló hormon). A neuronok másik csoportját az AgRP idegsejtek adják, nevüket a termelt Agouti-kapcsolt fehérjéről kapták, de termelnek továbbá neuropeptid Y-t (NPY) és gamma-aminovajsavat (GABA) is. Az AgRP neuronok orexigének, az MCR antagonistái, a táplálékfelvételt serkentik, az energiafelhasználást pedig csökkentik, az alfa-MSH hormonhatást blokkolják [35, 39].

Ezen neuronok receptorai kifejezetten érzékenyek és rapid módon válaszolnak a hormonváltozásra és a hormonszerű anyagok hatására [40–42], például az ösztrogének [43, 44], a pajzsmirigyhormonok [45] és a PPAR $\gamma$ -k is befolyásolják működésüket [46], melyek

összefüggésbe hozhatók az EDkkel. Az utóbbi évek fontos tanulmányozási területe lett, milyen módon történik ez a folyamat, és mivel az adaptív változások a sejtekben található mitokondriumok elváltozásainak függvényében jelentkeznek, így ezek részletes vizsgálata került előtérbe [47].

### 2.3 Mitokondrium morfológia

A mitokondriumok többnyire minden eukarióta sejtben megtalálható, az alfa-protobaktériumok osztályába tartozó endoszymbiontától származtatható, kettős membránnal határolt sejtorganellumok, melyek alapvető fontosságúak a sejtek metabolizmusában. A mitokondriumok szerkezeti elemei a külső membrán, a cristákkal tagolt (lemezes) belső membrán, a belső membrán által határolt mitokondriális mátrix és a két membrán közötti intermembrán tér (3. ábra). A belső membrán molekuláris összetételében is különbözik a szokványos egységmembránoktól: 80%-a fehérje, 20%-a lipid természetű anyag, melynek oka, hogy az elektrontranszportlánc fehérje komplexei és az ATP-szintáz transzmembrán enzim is itt foglal helyet [48].



3. ábra: A mitokondrium felépítése sematikus ábrán szemléltetve, Pánek és mtsai (2020) alapján.

A mitokondriumok jellemzően 2-8  $\mu\text{m}$  nagyságú ellipszoid alakú organellumok, számuk a sejtípustól függően néhány és több ezer darab között ingadozhat, a sejtben belül képesek elmozdulni az energiaigény függvényében [49], ezt fúziós és hasadási folyamatok, valamint a mitofágiát szabályozó rendszerek kontrollálják [50]. A mitokondrium képes külső és belső struktúráját egyaránt változtatni, amely hatással van annak funkciójára, ugyanakkor ez visszafelé is igaz [51], ezt a kétirányú folyamatot nevezzük morfofunkciónak. A

mitokondriumok alakja alapvetően meghatározza annak metabolikus aktivitását, például az elongált, fuzionált mitokondriumban hatékonyabb az ATP szintézis, míg a fragmentált, kerekesebb mitokondriumokban a ROS termelés fokozottabb, így hajlamosabb a mitofágiára [52]. A morfofunkcióból következően a mitokondriumok sérülése egyértelműen patológiás elváltozásokhoz vezethet, például anyagcsere és neurodegeneratív megbetegedésekhez.

Az NRk szerepe az EDk hatásában a szöveti funkciók tekintetében mára már tisztázott [53, 54], az intracelluláris folyamatok mindemögött azonban még nem teljesen. Az elmúlt években került előtérbe az EDk közvetlen hatásának vizsgálata a mitokondriumokra, hiszen az már kimutatott mind az As, ZEA és BPA esetén, hogy a mitokondriális ROS produkciót, a mitokondrium és az EndoR oxidatív stresszét növeli, továbbá mitokondriális DNS károsodást és membránpotenciálcsökkenést okoz, aktiválja a kaszpáz-3 és 9-es apoptotikus utakat [11].

A mitokondriális dinamika az ARC melanocortin rendszerben már bizonyítottan releváns a neuronok ingerlékenységével és a neuronális áramkör működésével kapcsolatban a viselkedésre és a perifériás szöveti funkciókra vonatkozóan, továbbá a hypothalamus AgRP és POMC neuronjai is fontos szerepet játszanak ezek meghatározásában. Mindezek következtében az AgRP és POMC neuronok tanulmányozása egy pragmatikus, új modellrendszert kínál a mitokondriumok szerepének megfejtésére az EDk nukleáris- és membránreceptorokra, illetve a sejtek, azokon keresztül pedig a teljes test fiziológiájára tett hatásának vizsgálatában.

### 3 Célkitűzések

A kísérlet célja, hogy bizonyosságot nyerjünk az EDk celluláris szintű működéséről a mitokondriumok morfológiájára kifejtett hatásukon keresztül. Feltételezzük, hogy ezen ultrastrukturális elváltozások által mélyebben megérthetőek lesznek a szöveti szinten kiváltott folyamatok. Az elváltozások három ED, az As, a ZEA és a BPA három különböző dózisban való adagolása függvényében kerülnek vizsgálatra *in vivo* egér modellen. Korábbi kutatások már kimutatták ezen hatóanyagok különböző receptorokra kifejtett hatását szöveti szinten, azonban a direkt celluláris hatásuk még nem teljesen tisztázottak.

A mintavételezés során az ARC AgRP és POMC neuronokat magába foglaló területére koncentrálnunk, figyelembe véve ezek közvetlen és nagymértékű kitétséget a keringésben jelenlévő kemikáliáknak, valamint meghatározó szerepét a szervezet endokrin rendszerének működésében és a homeosztázis fenntartásában. Kísérletünk alapjául a mitokondriumok kerültek elbírálásra, ugyanis mint a sejt energiaháztartásának szabályozója, morfofunkciójában bekövetkező bármely változás befolyásolja a sejt fiziológiás működését.

A mitokondriumok morfológiai jellemzői, úgymint azok mérete, belső struktúrája, alakbeli elváltozása, fúziója, mitofágiája, továbbá az EndoR-mal való kapcsolata transzmissziós elektronmikroszkópos (TEM) képalkotó eljárással megfigyelhető és elemezhető, ezért ezt az elemzési technikát „gold standard” módszerként alkalmazzuk.

Hipotézisünk szerint a mitokondriumok morfológiájában, számában és az EndoR-rel való kapcsolatában bekövetkező változások alapvető fontosságúak az EDk által kiváltott szöveti szinten zajló folyamatokban. Ezen ultrastrukturális jellemzők által mélyebben megismerhetjük a szóban forgó endokrin károsítók sejtszintű hatásmechanizmusát. Feltételezzük, hogy az egyes hatóanyagok különböző koncentrációkban sejtípus-függő módon, ED indukálta ultrastrukturális elváltozásokat generálnak, és mindezek az AgRP és POMC neuronokban különösen jól megfigyelhetőek lesznek.

## 4 Anyag és módszer

### 4.1 Helyszín és kísérleti állatok

Az állatok tartása és a kísérletek végrehajtása egyaránt az Állatorvostudományi Egyetem Élettani és Biokémiai Tanszék állatházában és laboratóriumában zajlott. A laboratórium teljesen felszerelt, légkondicionált helység, mely a kísérletek végrehajtásához megfelelő. Az elektronmikroszkóp használatát a Patológia Tanszék biztosította. A kísérleti állatok NMRI BP, vegyes ivarú, 18 napos egerek, az állatházban az egerek nevelésének megfelelő körülmények biztosítva vannak, csapvizet és általános egér eleséget *ad libitum* kaptak, 12 óra mesterséges megvilágításban, majd 12 óra sötétségben tartottuk őket. A kísérletek végrehajtásához szükséges állatvédelmi engedéllyel rendelkezünk (PE/EA/1252-6-2016), az állatokat az Európai Tanács direktívái (86/89/EEC) szerint kezeltük, az összes eljárást felülvizsgálta és jóváhagyta a helyi etikai bizottság.

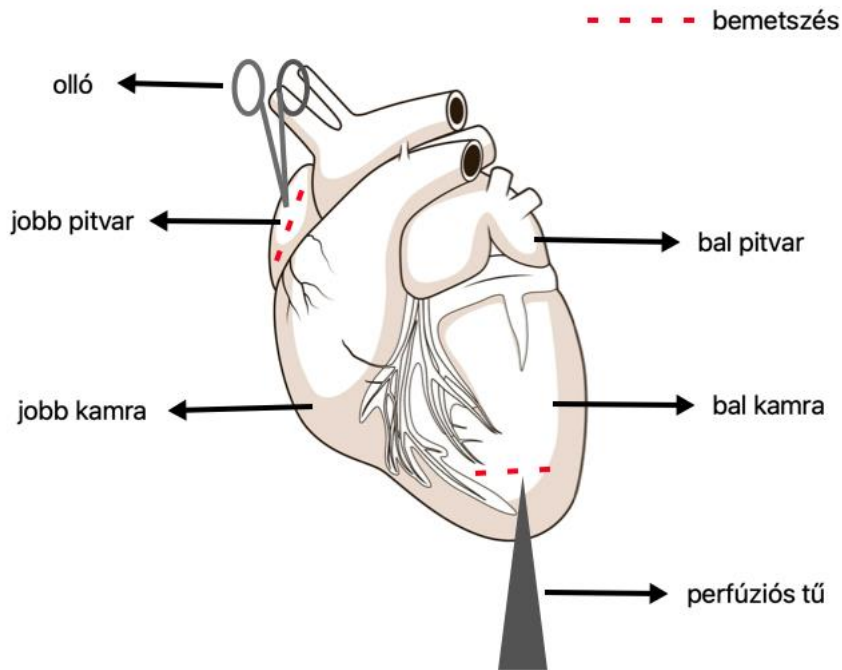
### 4.2 Kísérleti elrendezés

A kezelési csoportok a három vegyszer három dózisban történő beadása és egy kontroll csoport. Kezelési csoportonként három állattal dolgoztunk. A vegyszerek intraperitoneális injekció formájában kerültek beadásra 6 órával a perfúzió előtt. A három fő csoport a nátrium-arzenit, ZEA és BPA, melyek testtömeg kilogrammonként 40 µg, 5 mg és 10 mg dózisban kerültek beadásra. A kontroll csoport kezelése 0,9% NaCl oldattal történt. Az As NaCl oldószerrel, a BPA és a ZEA pedig fiziológiás sóoldatot és dimetil-szulfoxid (DMSO) oldószerrel keverve kerültek injektálásra. A törzsoldatok elkészítésére a kísérleteket megelőzően került sor a laboratóriumban, az egyes koncentrációkból 50 µl került beadásra adott állatnak.

### 4.3 Mintavétel

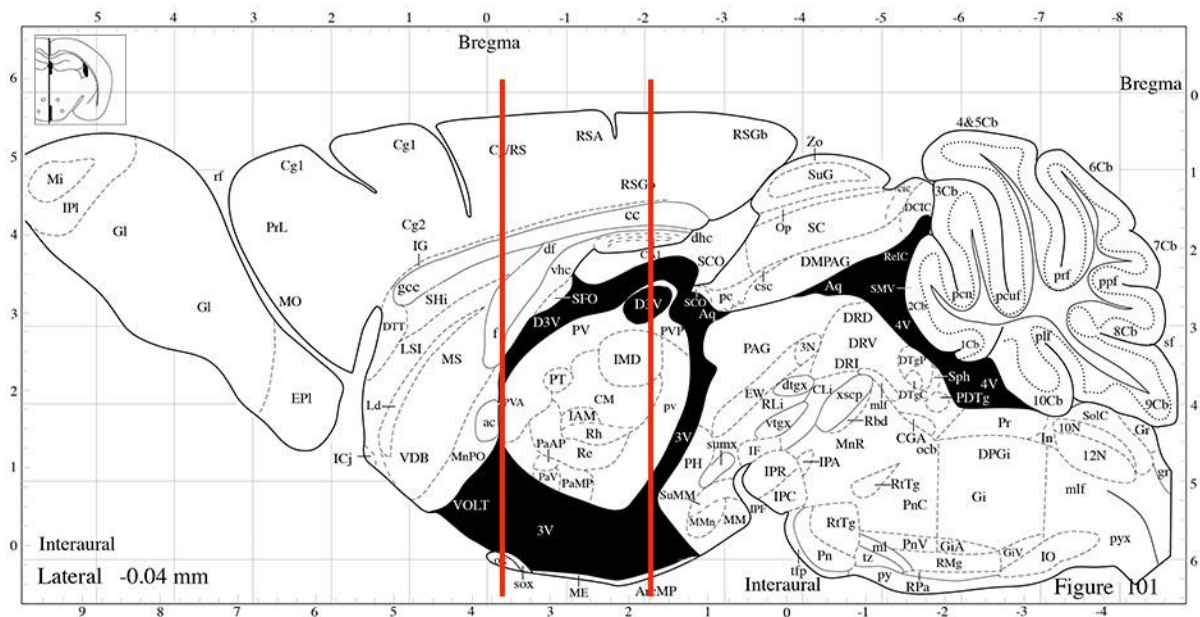
A mintavételre a kezelő oldatok injektálását követően 6 óra elteltével került sor, az állatokat először izofluránnal extermináltuk, majd hátán fekvé rögzítettük a padon. Az altatás alatt a perfúziós csövet csatlakoztattuk a fiziológiás sóoldatot tartalmazó palackhoz és buborékmentesítettük. A perfúzió megkezdéséhez a hasüreg feltárását a lapátos porc mögötti medián bemetszéssel végeztük. A rekesz ínlemezeit lefejtettük az eredési pontjaikról. A mellkast a mellkasbejáratig bilaterálisan, caudo-craniális irányú borda átmetszésekkel tártuk fel. A keletkező lebenyszerű, ventrálisan helyeződő mellkasfalrészletet caudo-craniális irányban felhajtottuk, ezzel a mellüregt teljes mértékben hozzáférhetővé téve. A szívburok eltávolítása után a bal kamrát egy 25G-s (5/8 0,5x16 mm) tűvel nyitottuk fel, a tűt pedig az *bulbus aortae*-ba vezettük. A jobb pitvar is megnyitásra került, helyet adva a vér és perfúziós

oldatok elfolyásának (4. ábra). Az érrendszer kimosását 0,9% NaCl és 25 000/3 l heparin oldattal végeztük, 5 ml/perc sebességgel 20-30 percig. A fixálás 4%-os paraformaldehiddel és 0,5%-os glutáraldehiddel történt, ezt a görcsök megszűnését követő 15 percig adagoltuk, ami 80-100 ml oldatot jelentett.



4. ábra: A szív megfelelő felnyitásának sematikus ábrázolása.

A fixált célszerv kiemeléséhez a fej közepén a bőrt a fejtetőtől az orrig felvágtuk, a koponyát kisollóval az öreglyuktól kétoldalt sagittális ívben vágtuk fel és emeltük le a koponyatetőt. Az agyat kiemelve, fejjel lefelé helyeztük az agymátrixba, így elérhetővé vált a basálisan helyezkedő hypothalamus, amelyről óvatosan csipesszel fejtettük le a kötőszövetet, majd a kisagy és agytörzs között végeztünk metszést. Az első vágás a *chiasma opticum* mögött, a második a *corpus mamillaren* történt, a coronális blokk meghagyásával (5. ábra). A kiemelt hypothalamust az előkészített 4%-os, pH 7,4-es paraformaldehid fixálóba helyeztük egy 20 ml-es szcintillációs üvegben és 4 °C-on tároltuk feldolgozásig.



5. ábra: A hypothalamust tartalmazó blokk kiemelésének módja. Az ábra Praxinos és Franklin (2001) *The mouse brain in stereotaxic coordinates: hard cover edition* alapján készült.

#### 4.4 Metszetkészítés

A metszetkészítést Leica vibratommal (Leica Biosystems, Wetzlar, Németország) végeztük, ehhez az agyszeletet 0,1 M foszfát pufferrel (PB) tartottuk nedvesen a metszés során, ugyanezzel került a vibratom csónakja is feltöltésre, a csónak metszetkészítőben való fixálása után behelyeztük a pengét a pengetartóba, majd az agyat papírtörlőn átforgattuk annyira, hogy az a szövettartón való ragasztásra megfelelően száraz legyen. Száradás közben beállítottuk a spotlámpát és a nagyítólencsét (2x), a csónakot felemeltük úgy, hogy a pengét a puffer ellepje teljesen. A pengét a blokk előtt 1-1,5 mm-re megállítottuk és rögzítettük, majd ugyanezt megtettük a blokk utáni részen is, így ablakot készítve. A levágott metszeteket vékony ecsettel emeltük ki a csónakból és PB-ben mostuk.

#### 4.5 Immunhisztokémia

A 60 µm-es metszetek elkészítését követően indirekt immunhisztokémiai módszerrel jelöltük meg a vizsgálni kívánt sejtszoportokat, az AgRP és POMC neuronokat külön metszeten. Ennek lényege egy antigén specifikus primer ellenanyag kötése a sejtspecifikus antigénekhez, majd egy, a primer ellenanyag ellen termelt szekunder ellenanyag kötése. Ez a jelölési módszer érzékenyebb, mint a direkt immunhisztokémiai eljárás.

Az inkubációs idők alatt 250-300-as percnkénti fordulatszámon a rázókeverőn tartottuk a mintákat. A jelölésre használt primer ellenanyagok nyúlban termeltek voltak, a POMC sejtek jelöléséhez poliklonális primer POMC ellenanyagot, az AgRP sejtek jelöléséhez pedig

poliklonális primer AgRP ellenanyagot használtunk (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). A szekunder jelölő mindkét esetben kecskében termelt anti-nyúl poliklonális ellenanyag volt (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Előhíváshoz ABC kits-et (avidin-biotin complex kits) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) és DAB-t (diaminobenzidin) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) használtunk.

#### 4.6 Beágyazás és ultrametszés

A levágott metszeteket az immunizálás után 0,1M PB-ben tároltuk, ezt az ozmiumozás követte OsO<sub>4</sub> oldattal 30-60 percig, majd újabb mosás történt PB-ben 10-15 percig. Következő lépésként 50-70-90-96-100%-os felszálló alkohol sorban, minden lépésben 6-7 percig mostuk a metszeteket, a 100%-os oldatban kétszer. Az inkubálást propilén-oxidban kétszer 3-5 percig végeztük, majd újabb inkubálás következett 1:1 arányú propilén-oxid:durcupan gyanta keverékben 30 percig. A blokkba való beágyazás során egy végleges durcupan gyantát használtunk, a buborékok elkerülése itt igen fontos volt, majd 24-48 órás inkubálás következett polimerizációs hőmérsékleten (60 °C).

Ezt követően készítettük el az elektronmikroszkópos ultravékony metszeteket Reichert ultramikrotómmal (Reichert Technologies, Buffalo, NY USA) 50-70 nm-es, illetve tájékozódásul szolgáló metszetként 300 nm-es méretben. Ezeket 300 meshes réz rácsoakra (gridekre) vittük fel. Minden kezelési csoport esetén célunk az volt, hogy állatonként 10 hasznos metszet kerüljön tárolásra, ezek 60 µm-es metszetek, a válogatás során a 10 metszetből 4 került beágyazásra 1 db tárgylemezre, minden tárgylemezről egy metszet egy hypothalamus területe került gyantablokkba, egy ilyen blokk 20 hasznos ultrametszetet kellett, hogy adjon, ami 5 gridre fért rá (300 mesh).

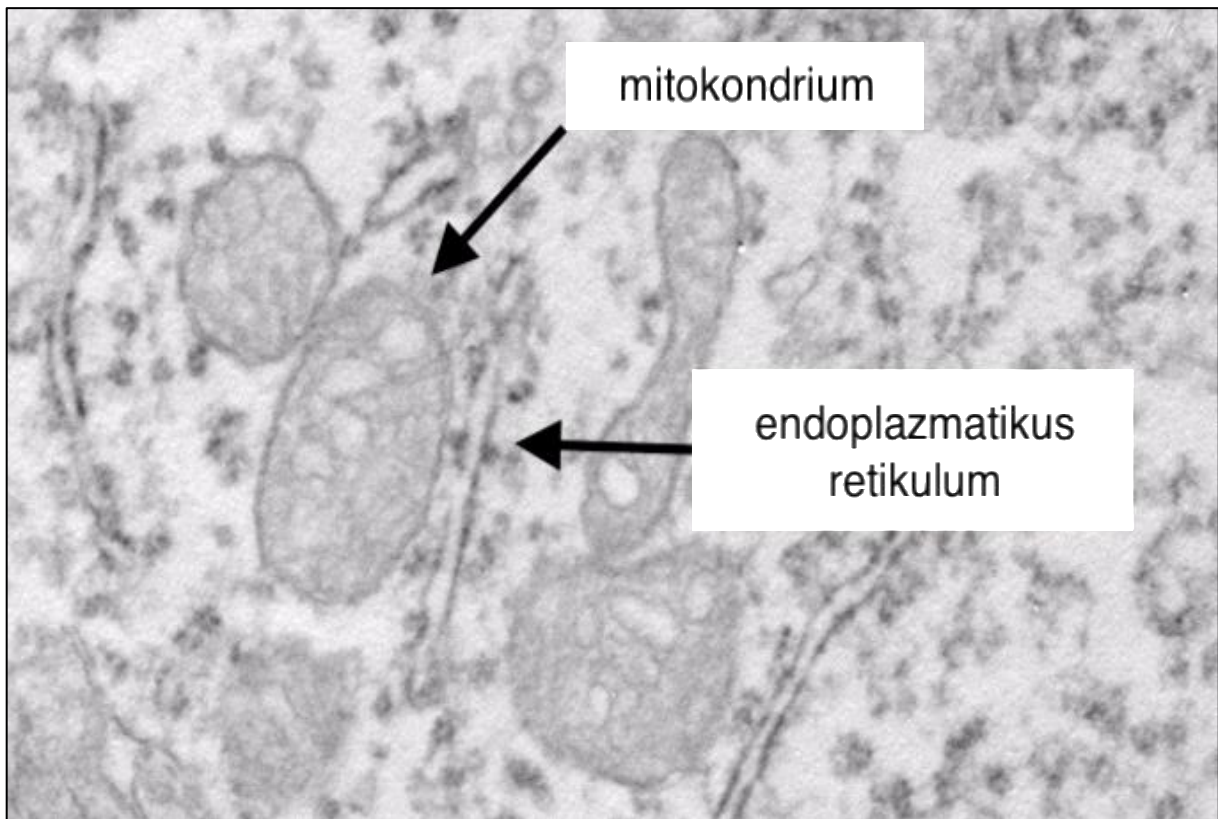
#### 4.7 Elektronmikroszkópia

A TEM a mai napig az úgynevezett „gold standard” a mitokondriumok kvalitatív és kvantitatív ultrastrukturális elemzésére, mind fiziológias, mind patofiziológias viszonyok között [55]. Az elkészült metszeteket JEOL-1011 TEM-pal (JEOL USA, Peabody, MA, USA) vizsgáltuk 80kV gyorsítófeszültség mellett az Állatorvostudományi Egyetem Elektronmikroszkópos Laboratóriumában. A digitális felvételek véletlenszerűen készültek el az ARC területén található POMC és AgRP neuronokról, 7 500x-os, 25 000x-es, valamint 50 000x-es nagyítási tartományban.



#### 4.8 Morfológiai elemzés

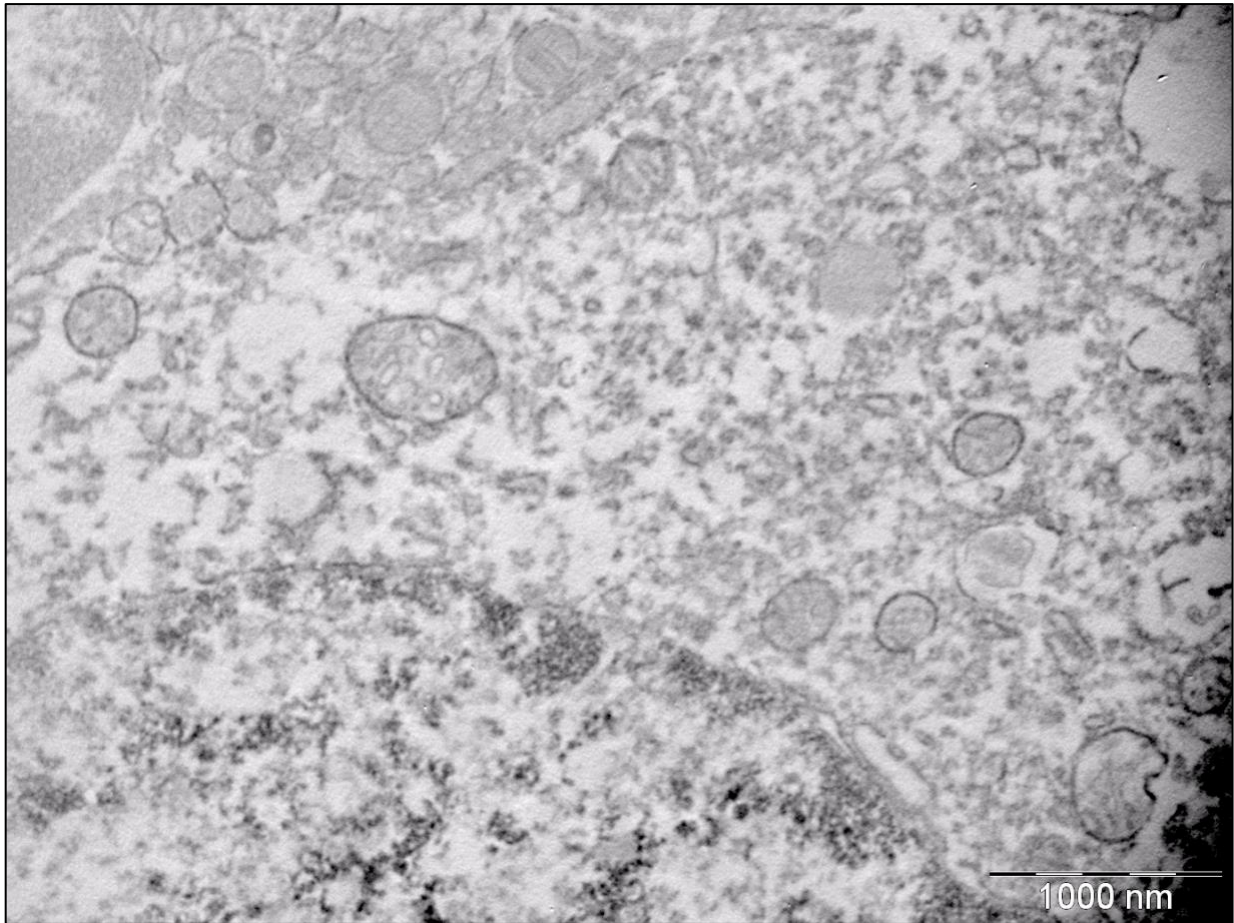
A kalibrált digitális elektronmikroszkópos felvételeken a mitokondriumokat az NIH Image J (ver. 1.52n) program segítségével kvantifikáltuk. A felvételeken azonosítottuk a mitokondriumokat, az EndoR-okat (6. ábra) és az alábbi paraméterek kerültek lemérésre: a mitokondriumok száma, az alakjukat leíró paraméterek, úgymint terület, a cristák területe és aránya a mitokondriumhoz képest, az EndoR-rel való kapcsolatok száma és távolságuk. A kapott adatokat Microsoft Excel (Microsoft, Microsoft Co., Redmond, WA, USA) táblázatokban összesítettük. A statisztikai elemzés R statisztikai környezetben történt, one-way ANOVA eljárással és Dunnett-posthoc teszt alkalmazásával.



6. ábra: A mitokondrium és EndoR morfológiája egy kontroll csoportból származó POMC neuronban.

Az elemzések  $5 \times 10^{-6}$  mm<sup>2</sup>,  $2 \times 10^{-5}$  mm<sup>2</sup> és  $2 \times 10^{-4}$  mm<sup>2</sup>-es felvételeken történtek túlnyomórészt, a mitokondriumok darabszámának vizsgálata során a  $2 \times 10^{-4}$  mm<sup>2</sup> látóterre vonatkoztatva számoltunk. Külön kerültek elbírálásra az AgRP és POMC neuroncsoportok mitokondriumai, valamint a különböző kezelési dózisos és EDk is, továbbá a kontroll csoport. Csoportonként 6-10 db megfelelő minőségűnek nyilvánított kép került elemzésre, összesen 195 db. A kapott adatokat Excel táblázatban gyűjtöttük össze és csoportonként kiszámítottuk a mitokondriumok átlagos területét (nm<sup>2</sup>), átlagszámát (db), a crista arányát a mitokondrium területéhez képest (%), a mitokondrium-EndoR kapcsolatok számát (db), lemértük a távolságot

ezen sejtoranellumok között (nm), illetve megfigyeltük az egymással adott területen szorosan érintkező, illetve fuzionált mitokondrium-EndoR előfordulását is (van/nincs) (7. ábra).

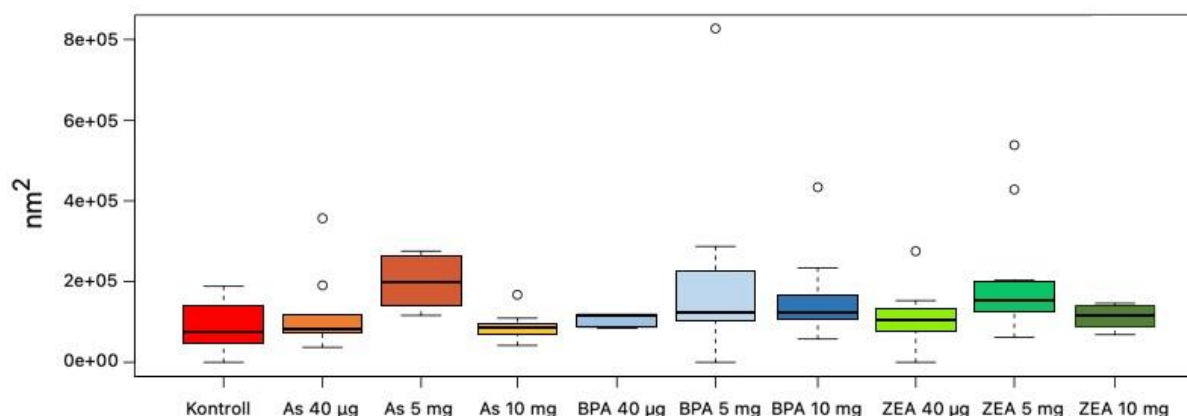


7. ábra:  $2 \times 10^{-5} \text{ mm}^2$  látóterű elektronmikroszkópos kép a kontroll csoportból (25 000x-es nagyítás).

## 5 Eredmények

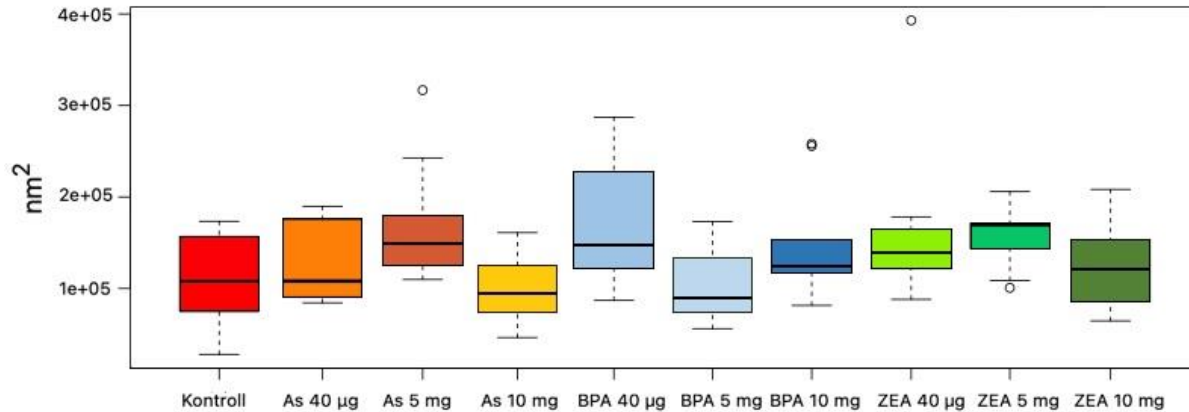
### 5.1 Mitokondriumok átlagmérete

A mitokondriumok területének meghatározása során adott kezelési csoportra vetített átlagterületekkel dolgoztunk. Ezek alapján az látható, hogy az As-nal kezelt AgRP, illetve POMC neuroncsoportokban is a kontrollhoz képest a 40  $\mu\text{g}$ -mal kezelt egyedekben a mitokondriumok mérete csökkent, majd az 5 mg-mal kezeltékben nőtt, a 10 mg-mal kezeltékben pedig ismét kisebb értékeket kaptunk. Ezt a méretbeli változást a kiugró (legnagyobb mitokondrium) értékek is tükrözték. Továbbá megfigyelhető, hogy az AgRP neuronokban a méretbeli különbségek valamivel nagyobb léptékűek, mint a POMC sejtek esetén. Szignifikáns különbséget az AgRP és POMC neuronokban is csak az 5 mg-mal kezelt csoport ( $p < 0,05$ ) mutatott átlagterület tekintetében. A legnagyobb mitokondrium méretet vizsgálva AgRP sejtekben az 5 mg-os ( $p < 0,001$ ), POMC sejtekben a 40  $\mu\text{g}$ -os ( $p < 0,05$ ) kezelési csoportok mutattak szignifikáns különbséget a kontrollhoz képest.



1. diagram: Mitokondriumok területének megoszlása a különböző kezelési csoportokban AgRP sejtek vizsgálata során.

A ZEA-nal kezelt csoportokban mind a 40  $\mu\text{g}$ -mal, 5 mg-mal és 10 mg-mal kezelt egyedekben is méretbeli növekedést láthatunk, azonban megfigyelhető, hogy itt is az 5 mg-os csoport mutat nagyobb növekedést, majd a 10 mg-os ehhez képest visszaesést mutat a mitokondriumok méretét tekintve. Továbbá az AgRP neuronok esetén itt is megállapítható, hogy erőteljesebb a növekedés mértéke. Szignifikáns különbséget a POMC neuronok esetén a 40  $\mu\text{g}$ -os és 5 mg-os csoport mutatott ( $p < 0,05$ ), AgRP sejteknél az 5 mg-os csoport ( $p < 0,01$ ). A POMC sejtekben a 40  $\mu\text{g}$ -os csoport legkisebb ( $p < 0,05$ ) és legnagyobb ( $p < 0,1$ ) mitokondriumot leíró értékei változtak szignifikánsan a kezelés hatására, AgRP neuronok vizsgálata során csak a legkisebb mitokondriumok az 5 mg-os kezelési csoportban ( $p < 0,05$ ).



2. diagram: Mitokondriumok területének megoszlása a különböző kezelési csoportokban POMC sejtek vizsgálata során.

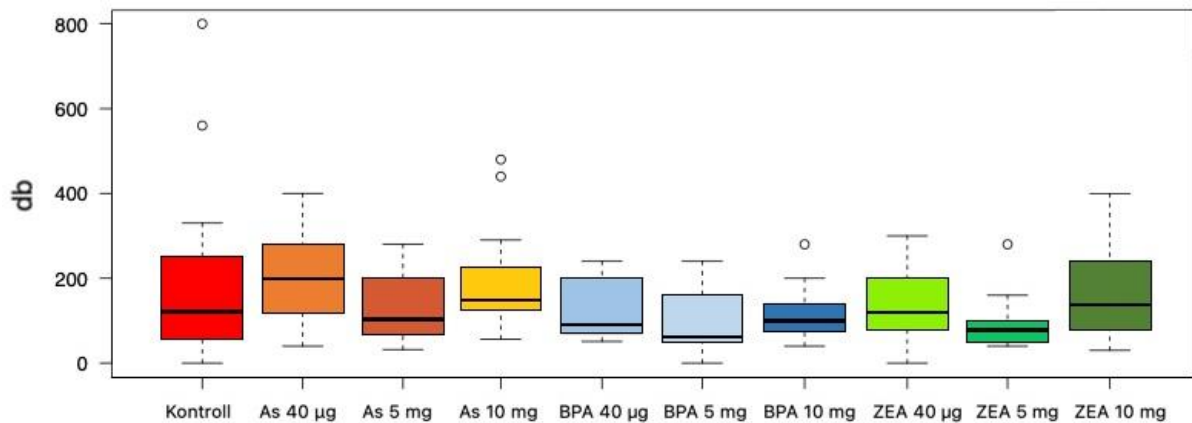
BPA kezelés hatására az AgRP neuronokban a 40 µg-mal kezelt csoport csupán minimális méretbeli növekedést mutat, az 5 mg-os csoport ennél jóval kifejezettebb, illetve a 10 mg-os is, habár az előbbinél kisebb mitokondriumokkal. POMC sejtek esetén a 40 µg-mal kezelt csoport mutat nagyobb volumenű növekedést, az 5 mg-os csoport igen minimálisat, majd a 10 mg-os szintén kifejezettebb. A legnagyobb mitokondriumokat vizsgálva a kontrollnál ugyan kisebb, de a három kezelési csoportból az 5 mg-osban találtunk kiemelkedően nagyméretűt, ezutóbbi egyértelműen a kezelés hatására jelentkezett POMC neuronok esetén ( $p < 0,05$ ). A legkisebb mitokondriumok is nagyobbak a kontrollban találhatóéhoz viszonyítva, ez a POMC sejtekben a 40 µg-os ( $p < 0,05$ ), AgRP sejtekben az 5 mg-os ( $p < 0,05$ ) és 10 mg-os ( $p < 0,1$ ) kezelési csoportokban is szignifikáns. A mitokondriumok átlagterületét tekintve POMC sejtekben a 40 µg-os ( $p < 0,05$ ) és a 10 mg-os ( $p < 0,1$ ) csoportok, AgRP sejtekben az 5 mg-os csoport ( $p < 0,01$ ) mutatott szignifikáns különbséget a kontrollhoz képest.

A mitokondriumok területének eloszlása AgRP neuronok vizsgálata során az 1. diagram-on, POMC neuronok esetén a 2. diagram-on látható.

## 5.2 Mitokondriumok száma

A mitokondriumok számát azon túl, hogy kezelési csoportonként, egységes látóterre vonatkoztatva vizsgáltuk, a statisztikai elemzéseinket is ezen adatokkal végeztük. As esetén csupán egy esetben találtunk több mitokondriumot a kontroll csoporthoz képest, a  $2 \times 10^{-4} \text{ mm}^2$  látóterű képeken, az AgRP neuronokban, a 40 µg-mal kezelt csoportban, azonban ez nem lett szignifikáns eredmény. Minden más esetben a mitokondriumok száma kevesebb lett, mint a kontrollban, azonban a hatóanyag koncentráció növelésével nem egyenes arányosságban csökkent a számuk, továbbá a 10 mg-mal kezelt csoportokban valamivel magasabb érték mutatkozik, mint a másik két kezelési csoportban (40 µg, 5 mg). POMC neuronokban a  $2 \times 10^{-4}$

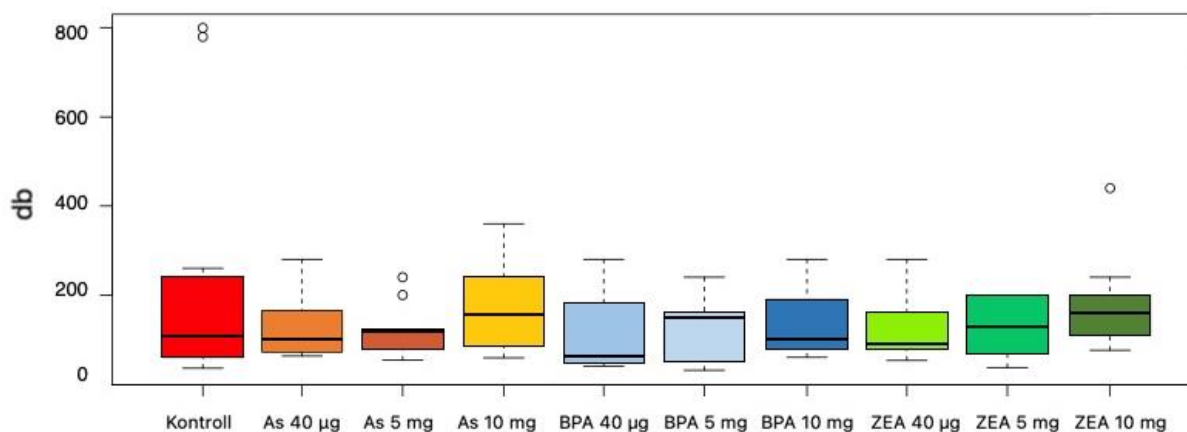
mm<sup>2</sup> látóterű képek esetén az 5 mg As-nal kezelt csoportokban látható valamivel magasabb érték, a 2x10<sup>-5</sup> mm<sup>2</sup>-es képek esetén ismét a 10 mg-mal kezelt csoportok adtak a kontrollnál ugyan alacsonyabb, de a másik két koncentrációnál nagyobb darabszámot. Az 5x10<sup>-6</sup> mm<sup>2</sup>-es képeknél született egy, a kontrollcsoporténál magasabb érték 10 mg-os kezelés mellett. Szignifikáns különbséget a kontrollhoz viszonyítva az As kezelés esetén csupán a POMC sejtek 5 mg-os kezelési csoportjában találtunk (p<0,1).



3. diagram: A mitokondriumok darabszámának eloszlása a különböző kezelési csoportokban AgRP neuronok esetén.

A ZEA-val kezelt csoportoknál is hasonló eredmények születtek, majdnem minden esetben alacsonyabb mitokondrium számot mértünk, kivéve a POMC sejtek közül a 2x10<sup>-4</sup> mm<sup>2</sup> látóterű képek tekintetében, a 40 µg-mal kezelt csoportot, ahol csaknem kétszeres mitokondrium darabszám növekedés látható. Egyébiránt az AgRP neuronokban jellemzően a 10 mg ZEA-nal kezelt egyedeknél láttunk magasabb mitokondrium számot, mint a 40 µg-mal, illetve 5 mg-mal kezelték esetén. Továbbá a POMC neuronokban a 10 mg-mal kezelt csoportban tapasztaltunk magasabb darabszámot, mint az 5 mg-mal kezeltben. Az 5x10<sup>-6</sup> mm<sup>2</sup>-es képek tekintetében a kontrollhoz képest minden esetben minimális eltérés volt látható. A statisztikai elemzés során a POMC (p<0,1) és az AgRP (p<0,05) sejtekben is az 5 mg-os kezelési csoport mutatott szignifikáns különbséget a kontrollhoz képest.





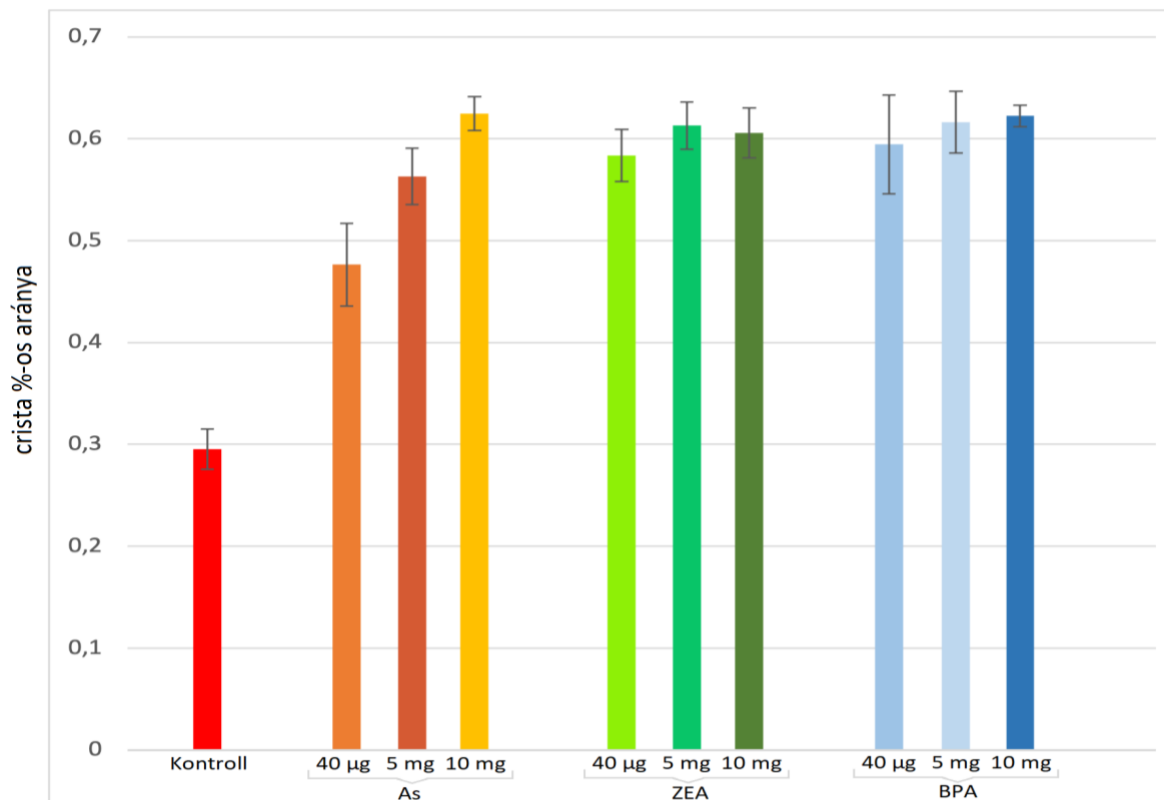
4. diagram: A mitokondriumok darabszámának eloszlása a különböző kezelési csoportokban POMC neuronok esetén.

Harmadik ED, a BPA esetén is alapvetően a kontrollhoz képest minden kezelt csoport alacsonyabb mitokondrium számot eredményezett, kivétel a POMC neuronok  $2 \times 10^{-4}$  mm<sup>2</sup>-es képeinek elemzése során, a 10 mg-mal kezelt egyedek magasabb értékeit. Ezt leszámítva itt is elmondható, hogy a 10 mg-os kezelési csoportok a másik két koncentrációnál magasabb értékeket mutattak. Továbbá két esetben, AgRP és POMC neuronoknál is a  $2 \times 10^{-4}$  mm<sup>2</sup>-es látótéren az 5 mg-os csoport a 40 µg-osnál magasabb mitokondrium darabszámot eredményezett, de a kontrollnál továbbra is alacsonyabbat. Szignifikáns különbség POMC sejtek vizsgálata során a 40 µg-os és az 5 mg-os kezelési csoportban lépett fel ( $p < 0,1$ ), AgRP sejtekben az 5 mg-os ( $p < 0,05$ ) és 10 mg-os ( $p < 0,1$ ) csoportokban.

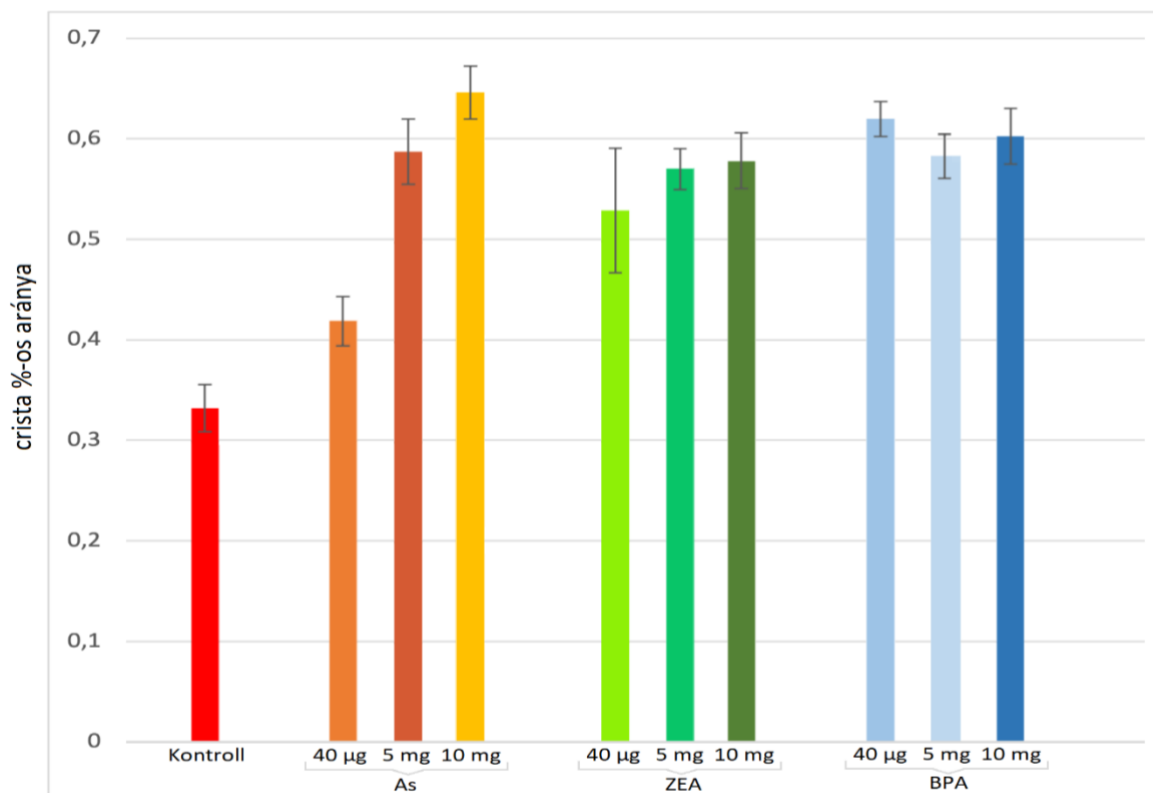
Az említett változások eloszlása AgRP sejtekben a 3. diagram-on, POMC sejtekben a 4. diagram-on látható.

### 5.3 Cristák

Mérésre került a cristák által elfoglalt terület a mitokondriumon belül, mely során a cristák határait adó belső membrán mentén kereteztük a behúzásokat és kaptuk meg a területet nm<sup>2</sup>-ben. Ezt viszonyítottuk a mitokondrium külső membránjának mentén lemerített teljes mitokondrium területhez és kaptuk meg a %-os eredményt. Az eredmények a POMC sejtekben a 40 µg-os As kezelési csoport kivételével minden kezelési csoportban, mindhárom hatóanyag esetén szignifikánsak ( $p < 0,0001$ ) lettek. Az As esetén közel azonos mértékben nőtt a crista aránya a mitokondrium területéhez képest mind az AgRP, mind a POMC sejtekben. Emellett látható, hogy a nagyobb mennyiségű hatóanyag befecskendezése arányosan nagyobb crista területet jelentett. A ZEA és BPA-val kezelt csoportokban ez az érték szintén nagyobb lett, mint a kontroll csoportban, azonban a hatóanyag koncentrációk ennek mértékét nem befolyásolták annyira, mint As esetén, közel azonos százalékos arányokat kaptunk mindhárom kezelési csoportban (5. diagram és 6. diagram).



5. diagram: Crista területének %-os aránya a mitokondrium területéhez képest AgRP neuronok vizsgálata során a különböző kezelési csoportokban.

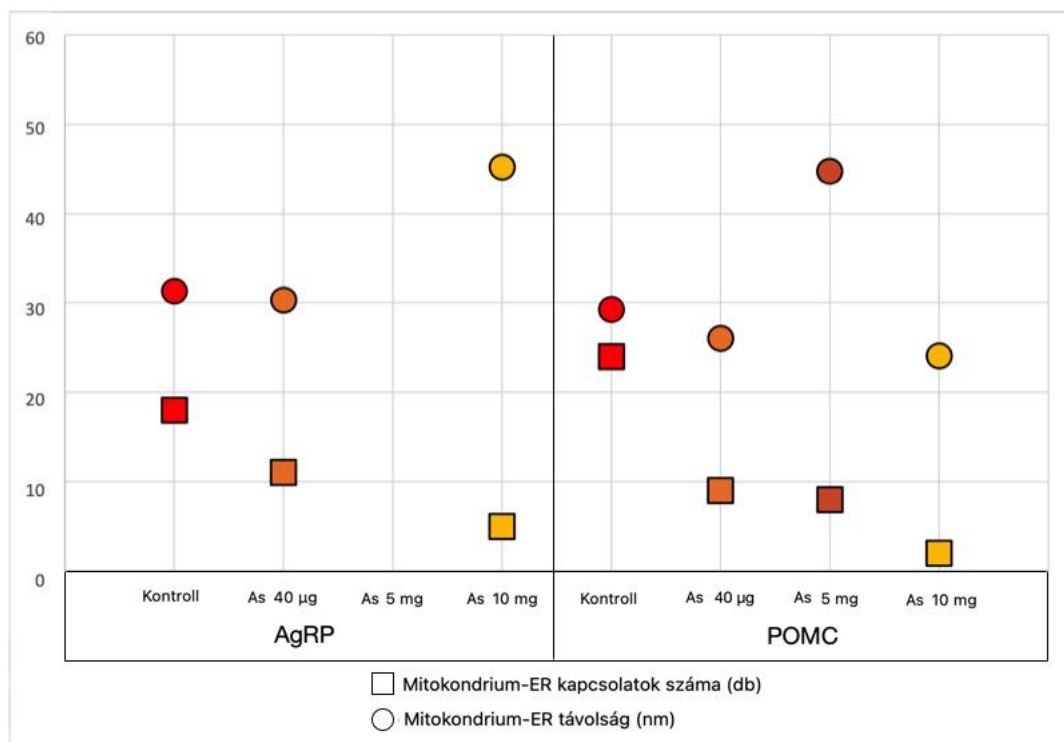


6. diagram: Crista területének %-os aránya a mitokondrium területéhez képest POMC neuronok vizsgálata során a különböző kezelési csoportokban.

## 5.4 Mitokondrium-endoplazmatikus retikulum kapcsolat

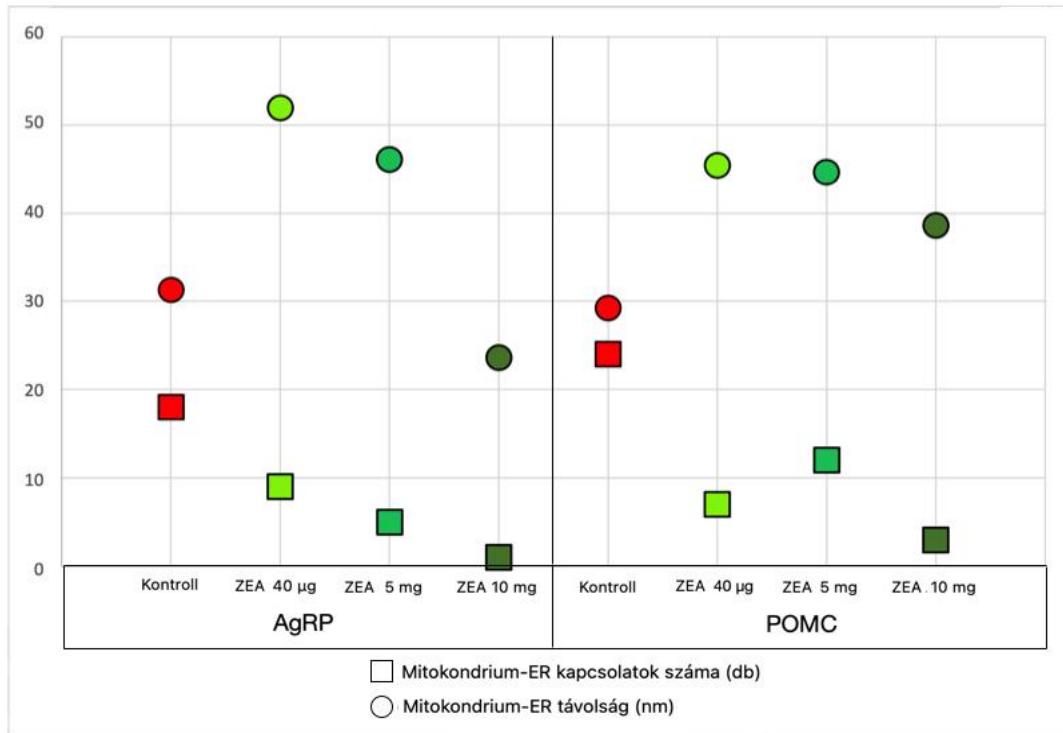
Az EndoR tekintetében megfigyelésre került a mitokondriumokkal való kapcsolatok száma, a két sejtorganellum között mérhető átlag távolságok hossza, valamint hogy jelen van-e olyan két sejtalkotó, amelyek esetén a távolság már olyan minimális, hogy az Image J program segítségével nincs lehetőség annak mérésére. Azon sejtkapcsolatok, ahol több, mint 100 nm távolság mérhető a mitokondrium és az EndoR között nem kerültek beszámításra az elemzés során, ugyanis ezekből elenyésző mennyiségű volt és kifejezetten kiugró értékeknek számítottak.

Az As-nal, ZEA-nal és BPA-val kezelt csoportokban egyaránt látható volt, hogy a kontrollhoz képest mindhárom hatóanyag kevesebb ilyen kapcsolatot eredményezett, valamint nagyobb átlagtávolságot is. Megfigyelhető, hogy az 5 mg As-nal, illetve a 40 µg BPA-val kezelt AgRP neuronokban egyetlen ilyen kapcsolat sem volt látható, ennél fogva pedig távolság sem volt mérhető (7. diagram-8. diagram-9. *diagram*). A két sejtorganellum közötti távolság statisztikai elemzése során nem lett szignifikáns különbség a kontroll csoporthoz képest, így ezen megfigyelések nem hozhatóak összefüggésbe egyértelműen az EDk hatásával.

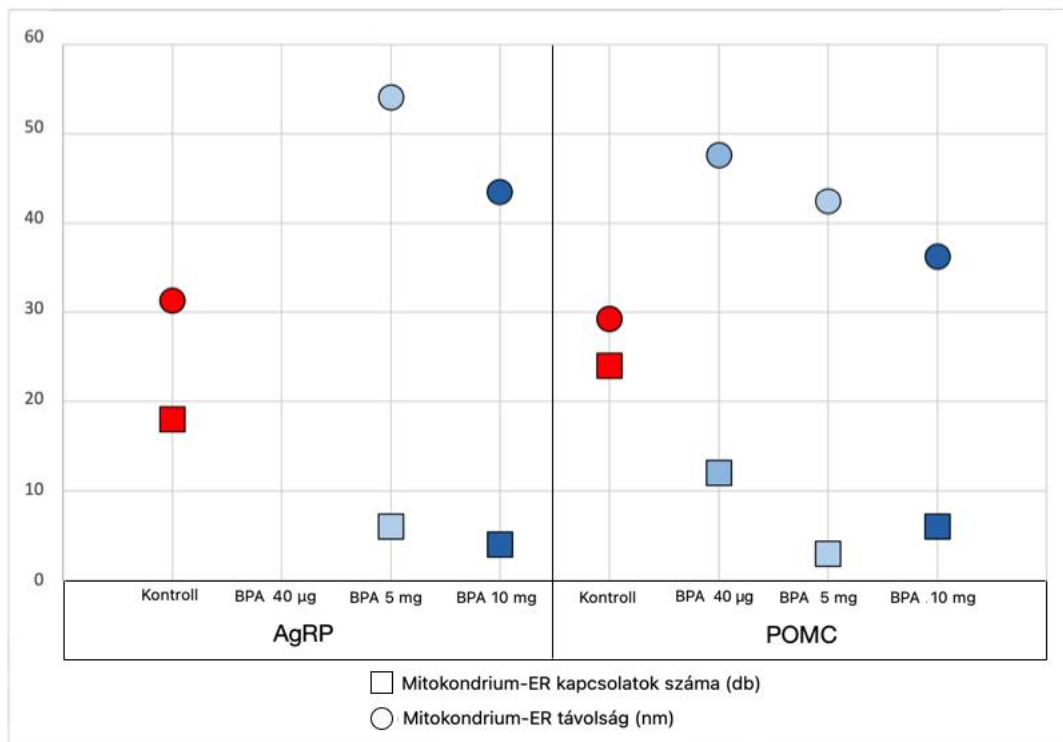


7. diagram: Mitokondrium és EndoR közötti kapcsolatok prezentálása az As kezelési csoportban AgRP és POMC neuronok vizsgálata során.





8. diagram: Mitokondrium és EndoR közötti kapcsolatok prezentálása a ZEA kezelési csoportban AgRP és POMC neuronok vizsgálata során.

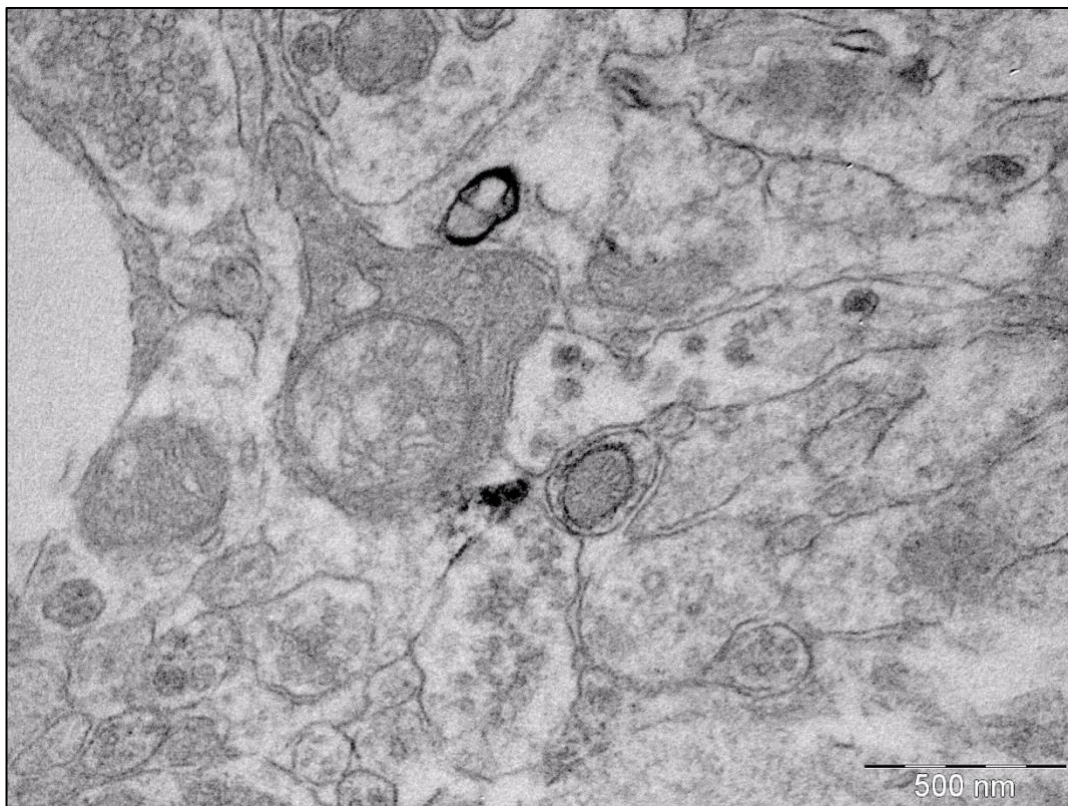


9. diagram: Mitokondrium és EndoR közötti kapcsolatok prezentálása a BPA kezelési csoportban AgRP és POMC neuronok vizsgálata során.

Az egymással szorosan érintkező mitokondrium és EndoR tekintetében elmondható, hogy a kontroll csoportban ilyen eset egyáltalán nem fordult elő, csupán az ED-ral kezeltekben. Az As csoportban csak a POMC neuronok között és csak az 5, illetve 10 mg ~~oldattal~~ kezelt egyedeknél találtunk ilyen szoros kapcsolatot. A ZEA kezelési csoportban AgRP sejtekben mindhárom koncentráció eredményezett ilyen elváltozást, míg POMC sejtekben a 40 µg-os csoport nem. BPA esetén mindkét neuroncsoportban csak az 5 mg, valamint 10 mg hatóanyaggal kezelt csoportokban volt látható ez a fajta kapcsolat.

### 5.5 További megfigyelések

Az alapvető méréseken túl figyelemmel voltunk egyéb sejten belül zajló jelenségekre is, így további információkat tudtunk leszűrni az EDkkel való kezeléseik kapcsán. A mitokondriumok morfológiájáról elmondható, hogy a kezelt csoportokban a duzzadt mitokondriális mátrix sokkal gyakoribb, az egyes képeken a mitokondriumok közel 100%-a mutatja ezt a morfológiai elváltozást. Megfigyeltük, hogy a kezelt csoportokban a kontrollal ellentétben, hatóanyag koncentráció függvényében egyre gyakoribb és egyre több lizoszóma látható, illetve az általuk bekebelezett mitokondriumok száma is növekszik (8. ábra). Továbbá a széteső, elmosódott szélű mitokondriumok száma is nagyobb volt a neuronokban.



8. ábra: Lizoszóma által bekebelezett mitokondriumok egy 40 µg arzénal kezelt egyed AgRP neuronjában (50 000x-es nagyítás).

## 6 Megbeszélés

Minden egészséges szervezetben, legyen az állati vagy emberi, a neuroendokrin rendszer egy igen érzékeny egyensúlyt tart fenn, mely külső (vagy belső) zavaró hatásra könnyen felborulhat. Az eddig a WHO (World Health Organization) által ED-ként elismert mind a 177 kemikália bizonyítottan hatással van ennek a belső egyensúlynak a működésére. Mivel az EDk számos neurodegeneratív, viselkedésbeli, endokrinológiai megbetegedéssel és diszfunkcióval hozhatók összefüggésbe, ennek okán kiemelt fontosságú a sejtszintű folyamatok megértése [56]. Annak érdekében, hogy az EDk okozta elváltozásokat képesek legyünk megfelelően gyógykezelní, illetve azok hatását kivédeni, különösen fontos megismerni a háttérben zajló patofiziológiás folyamatok egészét. Számos kutatás foglalkozott már az As, ZEA és BPA hormonális, valamint molekuláris hatásaival, a szakirodalom is felhívja a funkcionális és morfológiai elváltozások közti összefüggésre a figyelmet, ennek ellenére erre irányuló vizsgálatok lényegében nem történtek. Ennek fényében vizsgálatunk számos szempontból is igen fontos és elgondolkodtató eredményeket közöl.

### 6.1 Mitokondriumok átlagmérete

A mitokondriumok morfológiáját a három ED egyértelműen nagymértékben befolyásolja, és az elváltozás mértéke láthatóan a hatóanyag koncentrációtól is függ. Az As esetén a legtöbb kezelési csoportban méretbeli csökkenés látható, kivételt képez ez alól az 5 mg-os dózis, amely éppen növekedést generál. A ZEA és a BPA csoportokban ezzel szemben minden dózis méretbeli növekedést eredményezett a mitokondriumokban, különösképp igaz ez a 40 µg-os hatóanyagkoncentrációra a POMC neuronokban. Korábbi kutatások már bebizonyították, hogy a mitokondriumok mérete egyértelmű korrelációt mutat a sejt ATP-igényével [57]. Kutatási eredményeink arra engednek következtetni, hogy az ED hatásnak kitett sejtek nem megfelelő működése, akár apoptózisa összefüggésbe hozható a csökkent mitokondriummérettel és az ebből fakadó ATP-hiánnyal As kezelés esetén. A ZEA és a BPA kezelési csoportokban feltételezhető, hogy a sejteket ért ezen külső stressztényező kompenzálásként megnövelte a celluláris energiaigényt és a mitokondriumok méretbeli változása ehhez igazodik [58, 59]

### 6.2 Mitokondriumok száma

A mitokondriumok számának meghatározása is egyértelműsíti a három ED celluláris szintű hatását, a méretbeli változáshoz hasonlóan itt is bizonyított az összefüggés a sejt ATP-igénye és a mitokondriumok száma között [57]. Néhány kiugró értéktől eltekintve, elmondható, hogy a mitokondriumok száma a kontroll csoportéhoz képest lényegesen alacsonyabb, ezt leginkább

a  $2 \times 10^{-5}$  mm<sup>2</sup> látóterű képeken végzett mérések reprezentálják. A mitokondriumok számának csökkenését elsősorban a mitofágia eredményezi, a sérült, rosszul funkcionáló mitokondriumokat eltávolító, szelektív autofág rendszer. Mivel a mitokondriumok intramembrán terükben számos olyan fehérjét tartalmaznak, amelyek a sejt citoplazmájába jutva apoptogén hatásúak (citokróm-c, AIF, endonukleáz G), így sérülésük, illetve szétesésük a sejt fiziológiájának akár teljes felborulásához és apoptotikus utak aktiválásához vezethet [60]. A mitokondriumok számának csökkenése így arra enged következtetni, hogy a sejt alapvető ATP-hiányos állapotba kerül az EDk hatására, mindemellett pedig a szétesésük is hozzájárul a celluláris diszfunkcióhoz [58–60].

### 6.3 Cristák

A crista a mitokondrium funkcionális egységként szolgál, hiszen az oxidatív foszforilláció színtere, morfológiájában, arányaiban bekövetkező változások befolyásolják az ATP-képzés folyamatát és intenzitását. Kutatásunk során a cristák aránya a mitokondrium területéhez képest eltérő irányultságot mutat a fenti eredményekkel szemben, az As esetén a koncentrációtól függően egyre nagyobb százalékos eredményeket kapunk, míg a ZEA és a BPA kezelési csoportokban a kontrollnál magasabb, de a három koncentrációban közel azonos arányszámokat kapunk. A cristák tekintetében BPA kezelés hatására másik is hasonló eredményeket figyeltek meg a hippocampus neuronjaiban [61], valamint As-kezelés hatására a frontális cortexet vizsgálva [62]. Korábban már kimutatták a cristák szélesbedését a mitokondriumon belül apoptotikus stimulus hatására [63]. Mindez arra enged következtetni, hogy az EDk olyan folyamatokat generálnak sejtszinten, amely növeli a respirációs kapacitást, és ezáltal a crista arányát a mitokondriumon belül. Ez párhuzamba hozva a mitokondriumok számának és méretének csökkenésével – ami ATP hiányt okoz sejtszinten – azt feltételezi, hogy a cristákban bekövetkező változások igyekeznek kompenzálni a mitokondrium egyéb diszfunkcióját [57, 61–63].

### 6.4 Mitokondrium-endoplazmatikus retikulum kapcsolat

Az EndoR és a mitokondriumok között fennálló kapcsolatokra vonatkozóan az vonható le következtetésként, hogy a nagyobb hatóanyag koncentráció kevesebb organelum kapcsolatot, azonban a közöttük lévő távolság megnövekedését eredményezi. Ezzel kissé ellentmondóan, az egymással érintkező, illetve fuzionáló [64, 65] két sejtorganelum jelenlétére csak ezekben a csoportokban volt példa, a kontrollban nem. A nagyobb távolság a két sejtorganelum között gátolhatja a megfelelő mitokondriális funkciót, divíziót, illetve az apoptózis regulációt kalcium-ion hiányában [66]. Továbbá valószínűsíthető az autofagoszómák nem megfelelő termelődése

is, amelyek a mitokondrium-EndoR kapcsolódási pontokon (MERCs) képződnek és a citoplazmatikus komponensek (beleértve a lebontandó mitokondriumokat is) szállítását végzik a lizoszómák felé [67]. Ezutóbbit bizonyítja a lizoszómák megszáporodott száma is az ED-ral kezelt csoportok neuronjaiban.

## 6.5 Következtetések

Számos kutató hozta összefüggésbe az idegsejtek diszfunkcióját, degenerációját, illetve apoptózisát bizonyos EDk-kal, és figyelt meg minden esetben az összefüggést a mitokondriumok nem megfelelő funkciójával [32, 62, 68, 69]. A háttérben zajló folyamatokként elsődlegesen a citokróm-c fokozott termelését, a mitokondriális transzmembránpotenciál-csökkenését, a kaszpáz-3 és -9-as utak aktiválódását, a ROS-produkció fokozódását és az EndoR fokozott oxidatív stressznek való kitettségét állapították meg [13]. Ezentúl az általunk megfigyelt ultrastrukturális elváltozások arra engednek következtetni, hogy a sejtek egy alapvető energiahányos állapotba kerülnek az EDk hatására, amelyet ugyan a cristák morfológiai módosulása valamely mértékben kompenzálhat, de ez nem elegendő a sejt megfelelő működéséhez.

Hipotézisünket alátámasztva, eredményeink azt mutatják, hogy a vizsgált EDk morfológiai elváltozásokat okoztak a mitokondriumok ultrastruktúrájában és ezek párhuzamba állíthatók a már meglévő molekuláris eredményekkel. Bebizonyosodott az, hogy a hypothalamicus sejtek valóban rapid módon reagálnak ezen kemikáliák hatására, nemcsak molekuláris, hanem morfológiai elváltozások terén is. Ezen keresztül erősen feltételezhető, hogy az EDk hatással vannak nemcsak általánosságban a neuronok mitokondriális morfológiájára és azon keresztül a celluláris energiaháztartásra, hanem a hypothalamus funkciója kapcsán a teljes szervezet homeosztázisára is [70]. Arra azonban nem láttunk egyértelmű jelet, hogy a két sejtípus közül az egyik érzékenyebben reagálna az EDk okozta hatásokra, mint a másik. Az EDk dóziszfüggő hatására több ponton is láthattunk példát – a crista mitokondriumhoz mért arányának változásánál, a mitokondriumok területének változását vizsgálva és az EndoR-mal való kapcsolatok elemzése során is.

A jelenlegi eredmények még további párhuzamos morfológiai és molekuláris vizsgálatokat kívánnak, ennek ellenére már most felfedezhetők lényegi különbségek az ED-ok hatására a mitokondriumok ultrastrukturális jellemzőiben, számában, az EndoR-mal való kapcsolatában. A mitokondriumok megváltozott mérete összefüggésben lehet azok fúziójával, vagy éppenséggel a mitokondriumok osztódásával, amelyek a sejtek részéről történő energetikai adaptációs reakciók. További tervezett kísérleteink során a mitokondriális osztódás és fúziót

szabályzó gének és fehérjék működését/expresszióját szándékozunk meghatározni a jelen munkában ismertett kísérletes körülmények között. Ezen további kísérleti eredmények új jelentéssel fogják feltölteni a jelen eredményeinket, ennél fogva sokkal pontosabb és átfogóbb képet kaphatunk majd az egyes EDk hatásmechanizmusa közti különbségek feltárására is.

## 7 Összefoglaló

Kutatásunk során célunk az EDk okozta sejtszintű morfológiai elváltozások vizsgálata volt *in vivo* egér modellen. Az EDk olyan hormonális jelátviteli utakat képesek már igen kis mennyiségben is módosítani, amelyek meghatározzák a fejlődési, a reprodukív, az energiaháztartással, valamint a stressztűrővel kapcsolatos folyamatokat, tehát a homeosztázist sejtszinten befolyásolják. Korábbi kutatások már kimutatták a BPA, ZEA és az As direkt celluláris hatását, mint például az oxidatív stressz, mitokondriális DNS károsodás, apoptózis, membránpotenciál-csökkenés indukálását, az azonban mindmáig tisztázatlan, hogy ezen EDk akut formában is képesek-e kiváltani mitokondriális károsodást, és különös tekintettel, hogy ez megmutatkozik-e ultrastrukturális szinten, az energiaháztartás és ezzel a homeosztázis szabályozásban fontos szerepet játszó hypothalamicus melanocortin rendszer neuronjaiban, amelyek az e helyen módosult szerkezetű vér-agy gát miatt közvetlen ki vannak téve az EDk hatásának.

Kísérletünk során a fentnevezett EDket egyszeri intraperitoneális injektálással juttattuk a mindkét nembe tartozó juvenilis egerekbe, három különböző dózisban (40 µg, 5 mg és 10 mg). A kezelést követően 6 órával került sor a mintavételezésre, a hypothalamus kiemelésére. A melanocortin rendszer jellemző sejtjeit, az AgRP és a POMC neuronokat immunhisztokémiai eljárással jelöltük és TEM-pal vizsgáltuk. A vizsgált morfológiai paraméterek a következők voltak: mitokondriumok átlagos területe (nm<sup>2</sup>), átlagszáma (db), crista aránya a mitokondrium területéhez képest (%), mitokondrium-EndoR kapcsolatok száma (db), ezek közti átlagtávolság (nm), egymással szorosan érintkező, illetve fuzionált mitokondrium-EndoR előfordulása.

Az eredményekből leszűrhető az ED mitokondriumokra kifejtett hatása minden vizsgált paraméteren. A mitokondriumok átlagterületében egy növekedés, számukban megfogyatkozás, a cristák arányában szintén növekedés figyelhető meg, továbbá az EndoR-mal való kapcsolatok számának csökkenése és a köztük lévő távolság növekedése látható. Az AgRP és POMC neuroncsoportokban, illetve az egyes hatóanyagokban és különböző dózisaikban fellépő különbségek is prezentálásra kerültek.

Az EDk okozta ultrastrukturális változások kulcsfontosságúak azok hatásmechanizmusában, a kutatás alapján kijelenthetjük, hogy a sejtszintű folyamatok, azon belül is a mitokondriális morfofunkció különösen meghatározó tényező a későbbiekben, és alapjaiban befolyásolja a sejtszintű energiaháztartást, fehérjemetabolizmust, a neuronok közti megfelelő jelátvitelt, mindezek által pedig a szervezet egészére hatással van.

## 8 Summary

The goal of our research was to investigate morphological changes at the cellular level caused by EDs in an *in vivo* mouse model. EDs are able to modify hormonal signalling pathways, even in very small doses, which determine processes related to development, reproduction, energy balance and stress tolerance, thus influencing homeostasis at the cellular level. Previous research has already demonstrated the direct cellular effects of BPA, ZEA and As, such as the induction of oxidative stress, mitochondrial DNA damage, apoptosis, membrane potential reduction. However, it is still unclear whether these EDs can also, in acute form, induce mitochondrial damage, and in particular, whether this manifests at the ultrastructural level, in neurons of the hypothalamic melanocortin system that plays an important role in the regulation of energy balance and homeostasis, and that is directly exposed to EDs.

In our experiment, the above-mentioned EDs were administered by single intraperitoneal injection to juvenile mice of both sexes, in three different doses (40 µg, 5 mg and 10 mg). Sampling took place 6 hours after the treatment, and the hypothalamus was isolated. AgRP and POMC neurons, characteristic cells of the melanocortin system, were labelled by immunohistochemistry and examined by transmission electron microscopy. The examined morphological parameters were the following: average area of mitochondria (nm<sup>2</sup>), average number (pc), crista ratio compared to the area of mitochondria (%), number of mitochondria-EndoR connections (pc), average distance between them (nm), and the occurrence of closely contacting or fused mitochondria-EndoR.

Considering the results, the effect of ED on mitochondria can be deduced on all parameters examined. There is an increase in the average area of mitochondria and in the proportion of cristae, there is a decrease in the number of mitochondria and in the number of connections with the EndoR, while also an increase in the distance between the two organelles. Differences in the AgRP and POMC neuron groups, as well as the individual active substances and their different doses, were also presented.

The ultrastructural changes caused by EDs are crucial in their mechanism of action. Based on our results, we can state that in order to unveil the ED's effects, processes at the cellular level, and particularly mitochondrial morpho-function is of utmost importance considering its fundamental impact on the energy balance at the cellular level, protein metabolism, and the proper signal transmission between neurons, through all of these it affects the whole organism.



## 9 Irodalomjegyzék

1. Casals-Casas C, Desvergne B (2011) Endocrine disruptors: From endocrine to metabolic disruption. *Annu Rev Physiol* 73:135–16. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-012110-142200>
2. Caliman FA, Gavrilescu M (2009) Pharmaceuticals, personal care products and endocrine disrupting agents in the environment - A review. *Clean (Weinh)* 37(4-5) 277–303
3. Robins JC, Marsit CJ, Padbury JF, Sharma SS (2011) Endocrine disruptors, environmental oxygen, epigenetics and pregnancy. *Frontiers in Bioscience - Elite* 3 E(2) 690–700. <https://doi.org/10.2741/e279>
4. Timm GE, Maciorowski AF (2000) Endocrine disruptor screening and testing: A consensus strategy. *ACS Symposium Series* 747:. <https://doi.org/10.1021/bk-2000-0747.ch001>
5. Tabb MM, Blumberg B (2006) New modes of action for endocrine-disrupting chemicals. *Molecular Endocrinology* 20(3) 475–482
6. Preda C, Ungureanu MC, Vulpoi C (2012) Endocrine disruptors in the environment and their impact on human health. *Environ Eng Manag J* 11(9) 1697–1706. <https://doi.org/10.30638/eemj.2012.210>
7. Gore AC (2010) Neuroendocrine targets of endocrine disruptors. *Hormones* 9(1) 16–27
8. DeWitt JC, Patisaul HB (2018) Endocrine disruptors and the developing immune system. *Curr Opin Toxicol* 10:31–36
9. Kabir ER, Rahman MS, Rahman I (2015) A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health. *Environ Toxicol Pharmacol* 40(1) 241–258
10. Balaguer P, Delfosse V, Grimaldi M, Bourguet W (2017) Structural and functional evidences for the interactions between nuclear hormone receptors and endocrine disruptors at low doses. *C R Biol* 340(9-10) 414–420
11. Kumar D, Kumar Thakur M (2014) Perinatal exposure to bisphenol-A impairs spatial memory through upregulation of neurexin1 and neuroligin3 expression in male mouse brain. *PLoS One* 14(7) e0220212
12. Miltonprabu S, Sumedha NC (2014) Arsenic-induced hepatic mitochondrial toxicity in rats and its amelioration by diallyl trisulfide. *Toxicol Mech Methods* 24(2) 124–135. <https://doi.org/10.3109/15376516.2013.869778>
13. Banjerdpongchai R, Kongtawelert P, Khantamat O, Srisomsap C, Chokchaichamnankit D, Subhasitanont P, Svasti J (2010) Mitochondrial and endoplasmic reticulum stress pathways cooperate in zearalenone-induced apoptosis of human leukemic cells. *J Hematol Oncol* 3:50. <https://doi.org/10.1186/1756-8722-3-50>
14. Vandenberg LN, Chahoud I, Heindel JJ, Padmanabhan V, Paumgarten FJR, Schoenfelder G (2010) Urinary, circulating, and tissue biomonitoring studies indicate widespread exposure to bisphenol A. *Environ Health Perspect* 118(8) 1055–1070
15. Vandenberg LN, Hauser R, Marcus M, Olea N, Welshons W v. (2007) Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reproductive Toxicology* 24(2) 139–177
16. Pennie WD, Aldridge TC, Brooks AN (1998) Differential activation by xenoestrogens of ER $\alpha$  and ER $\beta$  when linked to different response elements. *Journal of Endocrinology* 158(3) R11-4. <https://doi.org/10.1677/joe.0.158R011>
17. Welshons W v., Nagel SC, vom Saal FS (2006) Large effects from small exposures. III. Endocrine mechanisms mediating effects of bisphenol A at levels of human exposure. *Endocrinology* 147(6) S56–S69

18. Moriyama K, Tagami T, Akamizu T, Usui T, Saijo M, Kanamoto N, Hataya Y, Shimatsu A, Kuzuya H, Nakao K (2002) Thyroid hormone action is disrupted by bisphenol A as an antagonist. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 87(11) 5185–5190. <https://doi.org/10.1210/jc.2002-020209>
19. Pajewska M, Łojko M, Cendrowski K, Sawicki W, Kowalkowski T, Buszewski B, Gadzała-Kopciuch R (2018) The determination of zearalenone and its major metabolites in endometrial cancer tissues. *Anal Bioanal Chem* 410(5) 1571-1582. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0807-7>
20. Pfeiffer E, Kommer A, Dempe JS, Hildebrand AA, Metzler M (2011) Absorption and metabolism of the mycotoxin zearalenone and the growth promotor zeranol in Caco-2 cells in vitro. *Mol Nutr Food Res* 55(4) 560–567. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201000381>
21. Escrivá L, Font G, Manyes L (2015) In vivo toxicity studies of fusarium mycotoxins in the last decade: A review. *Food and Chemical Toxicology* 78:185–206
22. Kriszt R, Krifaton C, Szoboszlai S, Cserháti M, Kriszt B, Kukolya J, Czéh Á, Fehér-Tóth S, Török L, Szoke Z, Kovács KJ, Barna T, Ferenczi S (2012) A New Zearalenone Biodegradation Strategy Using Non-Pathogenic *Rhodococcus pyridinivorans* K408 Strain. *PLoS One* 7(9) e43608. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043608>
23. Yin L, Burns K, Arao Y, Luh C, Korach K (2012) Differential estrogenic actions of endocrine-disrupting chemicals bisphenol A, bisphenol AF, and ZEAe through estrogen receptor alpha and beta in vitro. *Environment Health Perspectives* 120(7) 927-a285
24. Weidner M, Hüwel S, Ebert F, Schwerdtle T, Galla HJ, Humpf HU (2013) Influence of T-2 and HT-2 Toxin on the Blood-Brain Barrier In Vitro: New Experimental Hints for Neurotoxic Effects. *PLoS One* 8(3) e60484. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060484>
25. Kuiper-Goodman T, Scott PM, Watanabe H (1987) Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 7(3) 253–306. [https://doi.org/10.1016/0273-2300\(87\)90037-7](https://doi.org/10.1016/0273-2300(87)90037-7)
26. Mohammed Abdul KS, Jayasinghe SS, Chandana EPS, Jayasumana C, de Silva PMCS (2015) Arsenic and human health effects: A review. *Environ Toxicol Pharmacol* 40(3) 828–846
27. Mandal BK, Suzuki KT (2002) Arsenic round the world: A review. *Talanta* 58(1) 201–235
28. Cullen WR, Reimer KJ (1989) Arsenic Speciation in the Environment. *Chem Rev* 89:713–764. <https://doi.org/10.1021/cr00094a002>
29. Garelick H, Jones H, Dybowska A, Valsami-Jones E (2008) Arsenic pollution sources. *Rev Environ Contam Toxicol* 197:17–60. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-79284-2\\_2](https://doi.org/10.1007/978-0-387-79284-2_2)
30. Davey JC, Bodwell JE, Gosse JA, Hamilton JW (2007) Arsenic as an endocrine disruptor: Effects of arsenic on estrogen receptor-mediated gene expression in vivo and in cell culture. *Toxicological Sciences* 98(1) 75–86. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfm013>
31. Muñoz A, Chervona Y, Hall M, Kluz T, Gamble M v., Costa M (2015) Sex-specific patterns and deregulation of endocrine pathways in the gene expression profiles of Bangladeshi adults exposed to arsenic contaminated drinking water. *Toxicol Appl Pharmacol* 284(3) 330–338. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2015.02.025>
32. Chen Y, Wu F, Liu M, Parvez F, Slavkovich V, Eunus M, Ahmed A, Argos M, Islam T, Rakibuz-Zaman M, Hasan R, Sarwar G, Levy D, Graziano J, Ahsan H (2013) A prospective study of arsenic exposure, arsenic methylation capacity, and risk of cardiovascular disease in Bangladesh. *Environ Health Perspect* 121(7) 832–838. <https://doi.org/10.1289/ehp.1205797>
33. Sun HJ, Xiang P, Luo J, Hong H, Lin H, Li HB, Ma LQ (2016) Mechanisms of arsenic disruption on gonadal, adrenal and thyroid endocrine systems in humans: A review. *Environ Int* 95:61–68

34. Luiten PGM, ter Horst GJ, Steffens AB (1987) The hypothalamus, intrinsic connections and outflow pathways to the endocrine system in relation to the control of feeding and metabolism. *Prog Neurobiol* 28(1) 1–54
35. Toda C, Santoro A, Kim JD, Diano S (2017) POMC Neurons: From Birth to Death. *Annu Rev Physiol* 79(1) 209–236
36. Rodríguez EM, Blázquez JL, Guerra M (2010) The design of barriers in the hypothalamus allows the median eminence and the arcuate nucleus to enjoy private milieus: The former opens to the portal blood and the latter to the cerebrospinal fluid. *Peptides (N.Y.)* 31(4) 757–776
37. Gao Y, Tschöp MH, Luquet S (2014) Hypothalamic tanycytes: Gatekeepers to metabolic control. *Cell Metab* 19(2) 173–175
38. Gabriela Pop M, Crivii C, Opincariu I (2018) Anatomy and Function of the Hypothalamus. In: *Hypothalamus in Health and Diseases*
39. Ramamoorthy TG, Begum G, Harno E, White A (2015) Developmental programming of hypothalamic neuronal circuits: Impact on energy balance control. *Front Neurosci* 9(MAR) 126. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00126>
40. Somogyi V, Horváth TL, Tóth I, Bartha T, Frenyó LV, Kiss DS, Jócsák G, Kerti A, Naftolin F, Zsarnovszky A (2016) Bisphenol a influences oestrogen- and thyroid hormone-regulated thyroid hormone receptor expression in rat cerebellar cell culture. *Acta Vet Hung* 64(4) 497–513. <https://doi.org/10.1556/004.2016.046>
41. Zsarnovszky A, Kiss D, Jocsak G, Nemeth G, Toth I, Horvath TL (2018) Thyroid hormone- and estrogen receptor interactions with natural ligands and endocrine disruptors in the cerebellum. *Front Neuroendocrinol* 48:23–36
42. Jocsak G, Kiss DS, Toth I, Goszleth G, Bartha T, Frenyo L v., Horvath TL, Zsarnovszky A (2016) 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) 619. <https://doi.org/10.3390/ijerph13060619>
43. Gao Q, Mezei G, Nie Y, Rao Y, Choi CS, Bechmann I, Leranth C, Toran-Allerand D, Priest CA, Roberts JL, Gao XB, Mobbs C, Shulman GI, Diano S, Horvath TL (2007) Anorectic estrogen mimics leptin's effect on the rewiring of melanocortin cells and Stat3 signaling in obese animals. *Nat Med* 13(1) 89–94. <https://doi.org/10.1038/nm1525>
44. Scalise T, Gyo'rffy A, Tóth I, Kiss D, Somogyi V, Goszleth G, Bartha T, Frenyó L, Zsarnovszky A (2012) Ligand-induced changes in Oestrogen and thyroid hormone receptor expression in the developing rat cerebellum: A comparative quantitative PCR and Western blot study. *Acta Vet Hung* 60(2) 263–284. <https://doi.org/10.1556/AVet.2012.023>
45. Coppola A, Liu ZW, Andrews ZB, Paradis E, Roy MC, Friedman JM, Ricquier D, Richard D, Horvath TL, Gao XB, Diano S (2007) A Central Thermogenic-like Mechanism in Feeding Regulation: An Interplay between Arcuate Nucleus T3 and UCP2. *Cell Metab* 5(1) 21–33. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.12.002>
46. Diano S, Liu ZW, Jeong JK, Dietrich MO, Ruan H bin, Kim E, Suyama S, Kelly K, Gyengesi E, Arbiser JL, Belsham DD, Sarruf DA, Schwartz MW, Bennett AM, Shanabrough M, Mobbs C v., Yang X, Gao XB, Horvath TL (2011) Peroxisome proliferation-associated control of reactive oxygen species sets melanocortin tone and feeding in diet-induced obesity. *Nat Med* 17(9) 1121–1127. <https://doi.org/10.1038/nm.2421>
47. Dietrich MO, Bober J, Ferreira JG, Tellez LA, Mineur YS, Souza DO, Gao XB, Picciotto MR, Araújo I, Liu ZW, Horvath TL (2012) AgRP neurons regulate development of dopamine neuronal plasticity and nonfood-associated behaviors. *Nat Neurosci* 15(8) 1108–1110. <https://doi.org/10.1038/nn.3147>

48. Wunderlich L, Szarka A (2014) *A biokémia alapjai*. Typotex Kiadó, Budapest
49. de Vos KJ, Allan VJ, Grierson AJ, Sheetz MP (2005) Mitochondrial function and actin regulate dynamin-related protein 1-dependent mitochondrial fission. *Current Biology* 15(7) 678–683. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.02.064>
50. Boguszewska K, Szewczuk M, Kazmierczak-Baranska J, Karwowski BT (2020) The Similarities between Human Mitochondria and Bacteria in the Context of Structure, Genome, and Base Excision Repair System. *Molecules* 25(12) 2857
51. Bulthuis EP, Adjobo-Hermans MJW, Willems PHGM, Koopman WJH (2019) Mitochondrial Morphofunction in Mammalian Cells. *Antioxid Redox Signal* 30(18) 2066–2109
52. Giacomello M, Pyakurel A, Glytsou C, Scorrano L (2020) The cell biology of mitochondrial membrane dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 21(4) 204–224
53. Toporova L, Balaguer P (2020) Nuclear receptors are the major targets of endocrine disrupting chemicals. *Mol Cell Endocrinol* 502:110665
54. Kiss DS, Ioja E, Toth I, Barany Z, Jocsak G, Bartha T, Horvath TL, Zsarnovszky A (2018) Comparative analysis of zearalenone effects on thyroid receptor alpha (TR $\alpha$ ) and beta (TR $\beta$ ) expression in rat primary cerebellar cell cultures. *Int J Mol Sci* 19(5) 1440. <https://doi.org/10.3390/ijms19051440>
55. Duranova H, Valkova V, Knazicka Z, Olexikova L, Vasicek J (2020) Mitochondria: A worthwhile object for ultrastructural qualitative characterization and quantification of cells at physiological and pathophysiological states using conventional transmission electron microscopy. *Acta Histochem* 122(8) 151646
56. Seralini GE, Jungers G (2021) Endocrine disruptors also function as nervous disruptors and can be renamed endocrine and nervous disruptors (ENDs). *Toxicol Rep* 8:1538–1557
57. Justs KA, Lu Z, Chouhan AK, Borycz JA, Lu Z, Meinertzhagen IA, Macleod GT (2022) Presynaptic Mitochondrial Volume and Packing Density Scale with Presynaptic Power Demand. *Journal of Neuroscience* 42(6) 954–967. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1236-21.2021>
58. Li Y, Zhang B, Huang K, He X, Luo YB, Liang R, Luo H, Shen XL, Xua W (2014) Mitochondrial proteomic analysis reveals the molecular mechanisms underlying reproductive toxicity of zearalenone in MLTC-1 cells. *Toxicology* 324:55–67. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2014.07.007>
59. Rzemieniec J, Litwa E, Wnuk A, Lason W, Kajta M (2018) Bazedoxifene and raloxifene protect neocortical neurons undergoing hypoxia via targeting ER $\alpha$  and PPAR- $\gamma$ . *Mol Cell Endocrinol* 461:64–78. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.08.014>
60. Juhász G, Kovács A, László L, Lőw P (2013) *Az önmésztés, sejtpusztulás és megújulás molekuláris sejtbiológiája*. Eötvös Lóránd Tudományegyetem, Budapest
61. Goyal S, Tiwari S, Seth B, Tandon A, Shankar J, Sinha M, Singh SJ, Priya S, Chaturvedi RK (2021) Bisphenol-A inhibits mitochondrial biogenesis via impairment of GFER mediated mitochondrial protein import in the rat brain hippocampus. *Neurotoxicology* 85:18–32. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2021.04.001>
62. Prakash C, Soni M, Kumar V (2016) Mitochondrial oxidative stress and dysfunction in arsenic neurotoxicity: A review. *Journal of Applied Toxicology* 36(2) 179–188
63. Quintana-Cabrera R, Mehrotra A, Rigoni G, Soriano ME (2018) Who and how in the regulation of mitochondrial cristae shape and function. *Biochem Biophys Res Commun* 500(1) 94–101. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.04.088>
64. Sewer MB, Li D (2013) Regulation of adrenocortical steroid hormone production by RhoA-diaphanous 1 signaling and the cytoskeleton. *Mol Cell Endocrinol* 371(1-2) 79–86

65. Han L, Wang Y, Huang X, Liu F, Ma C, Feng F, Zhang J, Liu W, Qu W, Pang H, Xue J (2020) Specific-oxygen-supply functionalized core-shell nanoparticles for smart mutual-promotion between photodynamic therapy and gambogic acid-induced chemotherapy. *Biomaterials* 257:120228. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.120228>
66. Rowland AA, Voeltz GK (2012) Endoplasmic reticulum-mitochondria contacts: Function of the junction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13(10) 607–615
67. Kohler V, Aufschnaiter A, Büttner S (2020) Closing the Gap: Membrane Contact Sites in the Regulation of Autophagy. *Cells* 9(5) 1184
68. Huang CF, Liu SH, Su CC, Fang KM, Yen CC, Yang CY, Tang FC, Liu JM, Wu CC, Lee KI, Chen YW (2021) Roles of ERK/Akt signals in mitochondria-dependent and endoplasmic reticulum stress-triggered neuronal cell apoptosis induced by 4-methyl-2,4-bis(4-hydroxyphenyl)pent-1-ene, a major active metabolite of bisphenol A. *Toxicology* 455:152764. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2021.152764>
69. Thakur M, Rachamalla M, Niyogi S, Datusalia AK, Flora SJS (2021) Molecular mechanism of arsenic-induced neurotoxicity including neuronal dysfunctions. *Int J Mol Sci* 22(18) 10077
70. Papalou O, Kandaraki EA, Papadakis G, Diamanti-Kandarakis E (2019) Endocrine disrupting chemicals: An occult mediator of metabolic disease. *Front Endocrinol (Lausanne)* 10(MAR) 112

## 10 Köszönetnyilvánítás

Zárásként szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik segítségemre voltak a dolgozat megszületéséhez. Szeretnék köszönetet mondani Dr. Kiss Dávid Sándornak, aki témavezetőmként és mentoromként egyengette az utamat a dolgozat megírása alatt és osztotta meg velem tudását a témában kapcsolatban. Köszönet illeti Prof. Dr. Zsarnovszky Attilát, mint második témavezetőmet, amiért lehetővé tette, hogy ebben a témában dolgozhassak. Mindkettőjüknek hálás vagyok a gyors és alapos javításért és jó tanácsokért, amikkel elláttak. Köszönöm Prof. Dr. Bartha Tibor tanszékvezetőnek a téma befogadását.

Külön köszönet illeti Ósz Zsófiát, Kinálné Szikora Zsuzsannát és Magyar Tündét, amiért idejüket nem sajnálva segítettek megérteni a laboratóriumi kísérletek, az elektronmikroszkóp és a statisztika rejtelseit. Szeretném továbbá megköszönni Dr. Rácz Bencének, az elektronmikroszkópos laboratórium vezetőjének, hogy lehetővé tette a vizsgálatok elvégzését számunkra.

Végül, de nem utolsó sorban, köszönettel tartozom családomnak, páromnak és barátaimnak végtelen türelmükért és biztatásukért, valamint a többszöri átolvasásért, amellyel hozzájárultak a dolgozat végső formájának elnyeréséhez.

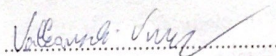
A kutatást az OTKA-115613 pályázat finanszírozta.

## NYILATKOZAT

Alulírott Valkovszki Vivien nyilatkozom, hogy diplomamunkám, melynek címe „Elektronmikroszkóppal detektálható morfológiai változások a hypothalamicus mitokondriumokban, As, ZEA és BPA endokrin diszruptorok hatására” tartalmi és formai szempontból teljes mértékben megegyezik azonos című, a 2022 évi TDK konferencián szerepelt dolgozatommal.

Budapest, 2022.11.14.

Valkovszki Vivien



a hallgató neve és aláírása



HuVetA  
ELHELYEZÉSI MEGÁLLAPODÁS ÉS SZERZŐI JOGI NYILATKOZAT\*

Név: Valkovszki Vivien

Elérhetőség (e-mail cím): kisvalkovszki1@gmail.com

A feltöltendő mű címe: Elektronmikroszkóppal detektálható morfológiai változások a hypothalamicus mitokondriumokban, As, ZEA és BPA endokrin diszruptorok hatására

A mű megjelenési adatai: 2022.

Az átadott fájlok száma: 1 db

---

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 szolgáltatassa a fenti dokumentumot (beleértve annak kivonatát is).

Beleegyezik, 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 anyagrészt 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, 2022. év 11. hó 14. 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, tudásvagyonát elektronikus formában összegyűjtse, rendszerezze, megőrizze, kereshetővé és hozzáférhetővé tegye, szolgáltatssa, 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 impakt faktorának növelése;*
- *az Állatorvostudományi Egyetem és az együttműködő partnerek tudásvagyonának koncentrált megjelenítése révén az intézmények és a hazai állatorvos-tudomány tekintélyének és versenyképességének növelése;*
- *a szakmai kapcsolatok és együttműködés elősegítése,*
- *a nyílt hozzáférés támogatása.*