

**ÁLLATORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM
ÉLETTANI ÉS BIOKÉMIAI TANSZÉK**

**ARZÉN, BISZFENOL-A ÉS ZEARALENON ER α ÉS ER β
TRANSZKRIPCIÓRA KIFEJTETT ÖNÁLLÓ HATÁSAINAK
ÖSSZEHASONLÍTÁSA EGÉR ÉS PATKÁNY MODELLEN**

Szerző: Németh Kata

Témavezető: Dr. Jócsák Gergely
Tudományos Munkatárs, Élettani és Biokémiai Tanszék

Budapest, 2020

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke.....	4
2. Bevezetés.....	5
3. Szakirodalmi áttekintés	7
3.1. Endokrin diszruptorok	7
3.2. Az ösztrogének és az ösztrogén receptorok.....	8
3.3. Arzén	11
3.3.1. Az arzén, mint endokrin diszruptor	11
3.3.2. Az arzén metabolizmusa	12
3.3.3. Az arzén hatásmechanizmusa	12
3.3.4. Az arzén a szervezetben.....	12
3.4. Biszfenol-A.....	13
3.4.1. A biszfenol-A, mint endokrin diszruptor	13
3.4.2. A biszfenol-A metabolizmusa és hatásmechanizmusa	15
3.4.3. A biszfenol-A a szervezetben	15
3.5. Zearelenon	16
3.5.1. A zearalenon, mint endokrin diszruptor.....	16
3.5.2. A zearalenon metabolizmusa	17
3.5.3. A zearalanon a szervezetben	18
4. Célkitűzések	21
5. Anyag és módszer	22
5.1. Állatok	22
5.2. Reagensek és anyagok	22
5.3. Sejtkultúrák előállítása	22
5.4. Kezelések.....	23
5.5. Reverz-transzkripció és kvantitatív-RT-PCR.....	23

5.6. Adatelemzés, statisztika.....	24
6. Eredmények.....	25
6.1. ER α mRNS expresszió változása a kezelések hatására	25
6.2.ER β mRNS expresszió változása a kezelések hatására	27
7. Megbeszélés, következtetések.....	29
8. Összefoglaló	34
9. Summary	35
10. Irodalomjegyzék.....	36
11. Köszönetnyilvánítás és egyéb nyilatkozatok.....	43

1. Rövidítések jegyzéke

As	Arzén
As III	Arzenit
As V	Arzenát
BPA	Biszfenol-A
DMA _s III	Dimetil-arzenit
DMA _s V	Dimetil-arzenát
E2	17 β -ösztradiol
ED	Endokrin diszruptor
ER	Ösztrogén receptor
ER α	Ösztrogén receptor alfa
ER β	Ösztrogén receptor béta
MMA _s III	Monometil-arzenit
MMA _s V	Monometil-arzenát
ZAN	Zearalanon
ZEA	Zearalenon
α -ZAL	α -zearalanol
β -ZAL	β -zearalenol
α -ZEL	α -zearalenol
β -ZEL	β -zearalenol

2. Bevezetés

Az endokrin diszruptor (ED) elnevezés egy gyűjtőfogalom, mely magába foglalja mindazon anyagokat, amelyek bizonyos dózisban az állati vagy emberi szervezetbe kerülve, kémiai szerkezetüknek köszönhetően az endokrin rendszer receptorainak agonistájaként vagy antagonistájaként befolyásolják a hormonális működést.

A világon számos nemzetközi szervezet (EFSA, UNEP, WHO) közegészségügyi veszélyként ismeri el az endokrin diszruptorokat. Az utóbbi évtizedekben több mint 100 000 új vegyi anyagot vezettek be emberi felhasználásra, valamint az emberek környezetébe, amelyek jelentős része endokrin diszruptorként van nyilvántartva (vagy vár nyilvántartásra).

Az ED-okkal kapcsolatos aggodalmak elsősorban bizonyos vadon élő állatokban, halakban és ökoszisztémákban megfigyelt káros hatásoknak, egyes endokrin eredetű emberi betegségek fokozott előfordulásának és a laboratóriumi kísérleti állatoknál megfigyelt bizonyos környezeti vegyi anyagoknak való kitettség következtében bekövetkező endokrin rendellenességeknek tudhatóak be. Ezek az aggodalmak számos nemzeti kormányt, nemzetközi szervezetet, tudományos társaságot, a vegyipart és közérdekű csoportokat ösztönöztek kutatási programok létrehozására, konferenciák és workshopok szervezésére, valamint szakértői csoportok és bizottságok létrehozására az ED-okkal kapcsolatos kérdések kezelésére és értékelésére.

Az ED-ok szinte mindenhol megtalálhatóak. Az állati és az emberi szervezet folyamatosan több, különböző forrásból származó ED hatásának van kitéve. Ugyanakkor az ED-k a fiziológiás hormonokénál lényegesen kisebb dózisban is képesek megzavarni az endokrin rendszer működését, azonban a fiziológiásnál számottevően nagyobb dózisban is bekerülhetnek a szervezetbe. Ha az élőlény neuroendokrin szabályozása az ED-k által zavart szenved, az egyedszinten súlyos fejlődéstani, és élettani elváltozásokat is okoz. A felszívódott vegyület a szervezet legkülönbözőbb pontjait károsíthatja. Az ED-ok hatással vannak az immunrendszerre, a vese- és májműködésre, a szervezet homeosztázisára, a fejlődésre és a központi idegrendszerre egyaránt. Az állatok szaporító szervrendszereinek károsítása következtében állattenyésztési problémákat, és így jelentős - a gazdaságra nézve káros - hatást is képesek ezek az anyagok előidézni.

A rágcsálók évek óta a legelterjedtebb modellek az orvosbiológiai kutatásban. Figyelemre méltó elmozdulás történt az elmúlt két és fél évtizedben, az egerek a patkányokhoz képest egyre nagyobb szerepet kaptak az állatkísérletek során. Ebből adódóan egyre fontosabb figyelembe venni a patkányok és egerek közötti fiziológiai, anatómiai, biokémiai és

farmakológiai vonatkozású különbségeket, hogy a megfelelő modellrendszert tudjuk kiválasztani egy adott biológiai kérdéshez.

Jelen dolgozatban három ismert endokrin diszruptor, az arzén, a biszfenol-A és a zearalenon hatásait vizsgáltuk az ösztrogén receptorok kifejeződésére patkány és egér központi idegrendszeri sejkultúrákban különböző molekuláris-biológiai módszerek segítségével. Az arzén (As) egy a talaj- és ivóvizekben előforduló metalloid vegyület, a biszfenol-A (BPA) műanyagok ipari előállítása során keletkezik, mint melléktermék, a zearalenon (ZEA) egy az állati takarmány gombafertőzése következtében termelődő mikotoxin. Ezen anyagok kémiai szerkezetüknek köszönhetően képesek kötődni az ösztrogén receptorokhoz, ezáltal hatást gyakorolnak a neuroendokrin rendszerre.

A kutatás során az alábbi kérdésre kerestük a választ: a vizsgált ED-k hatása eltérhet-e nagyságrendben, illetve a hatás irányában (gátló- valamint stimuláló hatás) a két vizsgált állatmodellben.

3. Szakirodalmi áttekintés

3.1. Endokrin diszruptorok

Az endokrin rendszert károsító vegyületeket az Egyesült Államok Környezetvédelmi Ügynöksége (EPA) így határozta meg: "olyan szerek, amely zavarják a szervezetben lévő természetes hormonok szintézisét, szekrécióját, transzportját, megkötését vagy eliminációját, és amelyek felelősek a homeosztázis fenntartásáért, a szaporodásért, a fejlődésért és/vagy a viselkedésért. Leegyszerűsítve ez azt jelenti, hogy az endokrin diszruptorok (ED-k) olyan vegyi anyagok vagy vegyi keverékek, amelyek zavarják a normális hormonfunkciót (Kabir et al., 2015).

Ezek az exogén anyagok megváltoztatják a hormonális egyensúlyt azáltal, hogy beavatkoznak az élettani visszacsatolási mechanizmusokba, és/vagy megzavarják a specifikus sejtjeleket. Az ED-ok molekuláris szerkezete hasonló lehet bármelyik endogén hormonhoz, így - mint a leggyakoribb hatásmechanizmus - az anyagok kötődnek az adott hormonreceptorhoz, agonista vagy antagonistá hormonhatást válthatnak ki, vagy blokkolhatják azok hatását. Ezen receptorok révén az ED-k befolyásolhatják a központi idegrendszer működését, közvetlenül az endokrin mirigyeket és/vagy az effektor sejtek szabályozó központjainak működését (Jocsak et al., 2019).

Az endokrin rendszert károsító anyagok származhatnak természetes állati, emberi vagy növényi (fitoösztrogén) forrásokból is; azonban a nemzetközi aggodalmak többnyire a szintetikus vegyi anyagokra összpontosítanak (Casals-Casas & Desvergne, 2011). Mindennapi életük során mind az emberek, mind az állatok egyszerre vannak kitéve számos ED-nak (Zsarnovszky et al., 2007).

Az ED-k különféle utakon juthatnak be az emberi szervezetbe, például szennyezett élelmiszer vagy ivóvíz elfogyasztásával, kontaminált levegő belégzésével, intravénás úton vagy a bőrön át is felszívódhatnak. A csecsemők szervezetébe a placentán keresztül, szoptatással és a tüdőn keresztül juthat be (Kabir et al., 2015). A legtöbb ED lipofil, ezért át tudnak jutni a sejtmembránokon és a sejten belül az intracelluláris receptorokhoz kötődhetnek. Egyetlen ED kötődhet egy vagy akár több hormon receptorhoz is, és agonistaként vagy antagonistaként működhet. Az ED-k - hasonlóan sok endogén hormonhoz - szabad vegyi anyagként is továbbjuthatnak a keringési rendszerben, ezáltal az ED-k viszonylag magas biológiai hozzáférhetőséggel rendelkeznek (Gore et al., 2019).

Az ED-expozíció a célszervezet fejlődési stádiumától függően súlyos következményekhez vezethet. Az egész életen át tartó szövődmények (modifikációs hatások)

prenatálisan, az expozíció során alakulnak ki, majd később súlyos fejlődési rendellenességekben nyilvánulnak meg. A posztnatális beépülés főként az élettani funkciók reverzibilis, kóros elváltozásához vezet (aktivációs hatások) (Jocsak et al., 2019).

Az ED-k nemcsak a neuroendokrin szervek funkcióit és a központi idegrendszer bizonyos folyamatait károsíthatják, hanem a test központi szabályozásának megváltoztatásával a máj és a vese homeosztázisát, illetve funkcióit is károsítják a méregtelenítés során (Diamanti-Kandarakis et al., 2009; Kabir et al., 2015; Gore et al., 2019; Sabir et al., 2019). Az ED-k befolyásolják az immunválasz minőségét azáltal, hogy hatást gyakorolnak a T-sejtek számára, megváltoztatják a dendritikus sejtek és a makrofágok fiziológiáját. Az ED-expozíció hozzájárul számos anyagcsere-betegség megnyilvánulásához is. Ezenkívül az ED-k erőteljesen beavatkoznak az állatok szaporodásbiológiájába, ezáltal jelentős gazdasági veszteségeket okoznak az állatállomány termelékenységének csökkentése révén, nem is beszélve a lehetséges humán vonatkozásokról (Jocsak et al., 2019).

3.2. Az ösztrogének és az ösztrogén receptorok

A szervezetben megtalálható ösztrogének szteroidhormonok, amelyek közül a legnagyobb mennyiségben a 17β -ösztradiol (E2) termelődik (Kuhl, 2005). Az E2 két metabolitja, az ösztron (E1) és az ösztriol (E3), bár nagy affinitású ligandumok, sokkal gyengébb agonistaként hatnak az ösztrogén receptorokon (Heldring et al., 2007).

Az ösztrogének fontos szerepet töltenek be a szervezet szinte összes szövetének fejlődésében és szabályozásában. Ha a szabályozó hormonok egyensúlya megzavarodik (endogén vagy exogén tényezők hatására), az eredmény súlyos anatómiai és fiziológiai változásokhoz vezethet. Az ösztrogén-szabályozás zavara különféle tumorok kialakulásához vezethet, főleg az elsődleges és a másodlagos nemi szervekben, pl. az emlőben, a petefészekben és a prosztatában. A hiperösztrogenizmus számos kórfolyamattal áll összefüggésben, például a tromboembólia, a szívinfarktus és a stroke fokozott kockázatával (Deroo & Korach, 2006). Az ösztrogén-elégtelenség hatással van a központi idegrendszerre is.

Az ösztrogének fontos szerepet játszanak női nemi hormonként a reprodukzív folyamatok fenntartásában (Saito & Cui, 2018). Emellett hatást gyakorolnak a szív- és érrendszerre, az izom- és csontanyagcserére, az immunrendszerre (Heldring et al., 2007), a lipid- és szénhidrát metabolizmusra és az elektrolit egyensúlyra egyaránt (Vrtačnik et al., 2014). Az agyban az ösztrogének nemcsak a hipotalamusz és az agyalapi mirigy szintjén vesznek részt a neuroendokrin feedback-mechanizmus szabályozásában, hanem befolyásolják motoros és

kognitív funkciók szabályozását is. Újabban kiderült, hogy az ösztrogén védőfaktoroként hat az olyan neurodegeneratív rendellenességeknél, mint a Parkinson-kór és az Alzheimer-kór. A szabályozó és védő funkciók mellett az ösztrogének más szerepet is játszanak az idegsejtek fejlődése során (Beyer, 1999).

A menopauzát megelőzően a női szervezetben a petefészkek a vérben keringő ösztrogének legfontosabb forrásai, emellett fontos megjegyezni, hogy a terhesség alatt a placenta szintén jelentős mennyiségű E2-t állít elő. Az ösztrogének sokrétű szabályozó szereppel rendelkeznek a férfi szervezetben is, hiszen minden testi sejt fejlődése során fontos funkciókat töltenek be. A férfi szervezetben, illetve menopauzát követően a női szervezetben (a petefészkek csökkent működése miatt), a keringő ösztrogén mennyisége a nemi mirigyeken kívüli szövetek hormontermelésétől függ (Vrtačnik et al., 2014). Ezen szövetek mezenchimális sejteket tartalmaznak. Ezen sejtek megtalálhatóak az emlőkben, az oszteoblasztokban, a kondrocitákban, az aorta falának simaizomsejtjeiben, a vaszkuláris endotéliumban és az agy számos részében (Simpson, 2003).

Az ösztrogének szteroid jellegük miatt átdiffundálhatnak a sejtmembránon keresztül a sejtbe és így az intracellulárisan megtalálható ösztrogén receptorokhoz (ER-okhoz) kötődhetnek. A ER-k magreceptorok, amelyek aktiváció után dimerizálódnak és a specifikus génszakasz HRE (Hormone Response Element – hormonválasz régió) részéhez kötve modulálják a célgének expresszióját. Az ER-k két altípusra oszthatók: ösztrogén receptor alfa ($ER\alpha$) és ösztrogén receptor béta ($ER\beta$) (Ray et al., 2002; Heldring et al., 2007).

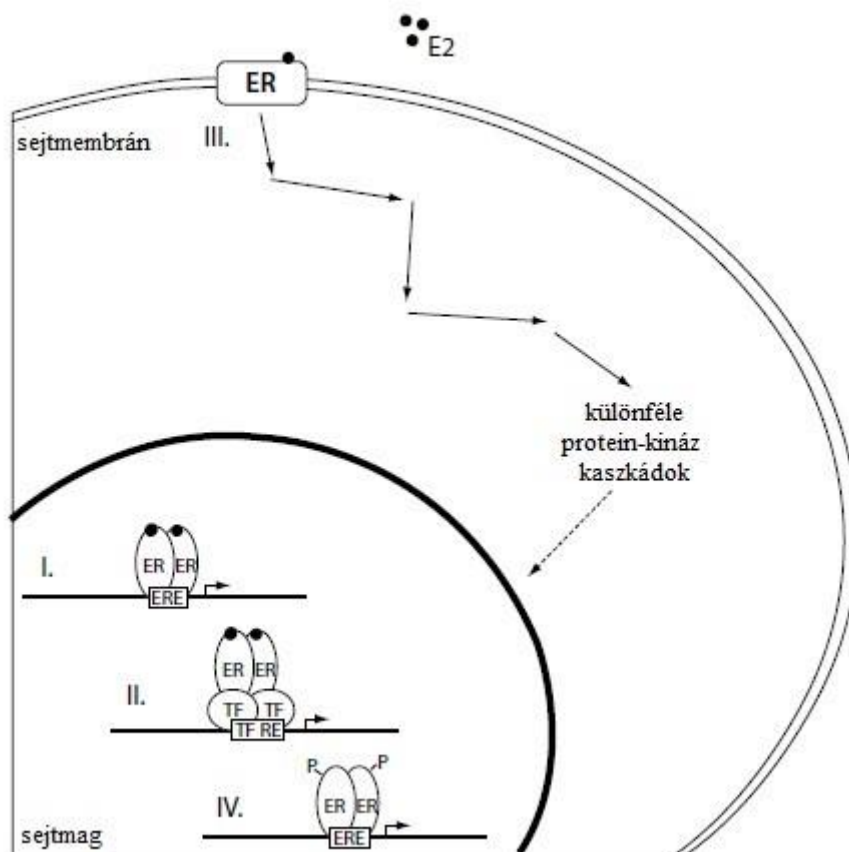
Az $ER\alpha$ receptor expressziójának mértéke összefügg a reprodukív funkcióval (Ogawa et al., 1998), ráadásul az $ER\alpha$ receptornak igen fontos szerepe van a posztnatális fejlődés során, szintje a fejlődés alatt folyamatosan változik bizonyos szövetekben, így szabályozva ezek megfelelő differenciálódását (Camacho-Arroyo et al., 2003). Az $ER\alpha$ és az $ER\beta$ kulcsfontosságú szerepet játszik az idegszövetek fejlődésében. Az $ER\alpha$ a magzati agyban és a korai posztnatális időszakban expresszálódik, ugyanakkor az $ER\beta$ expressziója az, ami egész életen át fennmarad a legtöbb idegsejtben (Belcher, 1999; L. Wang et al., 2001). Az $ER\beta$ szükséges az idegsejtek túléléséhez, kiiktatása a fejlődés során számos morfológiai elváltozáshoz vezet a kisgyermeki szövetekben, feltételezhetően azért, mert az ösztrogén hatások hiánya miatt a fejlődés alatt végbemenő sejt migráció szabályozása zavart szenved (L. Wang et al., 2001).

A nem megfelelő hormonszint fejlődési problémákhoz vezethet magzatokban vagy születés után. Az elégtelen ösztrogénszint azáltal, hogy megváltoztatja a szinapszisok fiziológiáját, az agy magasabb kognitív funkcióinak zavaraihoz áll összefüggésben, ami később

másodlagos viselkedési vagy pszichológiai problémákhoz is vezethet (L. Wang et al., 2001; Sherwin, 2003). Optimális esetben a hipotalamusz-hipofízis-gonád tengely az ösztrogén hatását a fiziológiai szintek között tartja, de mivel a szabályozási lánc a szervezet számos pontján befolyásolható, az egyensúly erősen sérülékeny az ösztrogénszerű anyagokkal, például az ED-okkal szemben. Az ED-k többsége különböző jelátviteli utakon keresztül fejtik ki hatásukat a sejtekben. Az ER-ok négy különböző útvonalon hatnak a sejtekben történő mRNS expresszióra, miután az E2 hozzájuk kötődött (1. Ábra):

- I. Genomiális ösztrogén szignál, az E2-ER dimer komplex kötődik a mag ERE (Estrogen Response Element – E2 hormonválasz régió) szekvenciáihoz.
- II. ERE független genomiális hatások a célgénekre.
- III. A membrán által indított nem genomikus E2 jelátvitel (ER-okon vagy GPR30 receptoron, MAPK és PI3K útvonalakon keresztül).
- IV. Ligandum-független jelátviteli út

Az endokrin diszruptorok megváltoztathatják a felsorolt útvonalak közötti finom egyensúlyt. Ezen folyamatok módja az ED-k típusától függ, hipotetikusan az összes biokémiai folyamat megváltozhat, amely a receptor aktiválása és a génátírás folyamata között történik. Az ED-ok az anyag szerkezetétől és biokémiai tulajdonságaitól függően a célreceptor agonistájaként vagy antagonistájaként működhetnek (Jocsak et al., 2019).



1. Ábra - Az ösztrogén által közvetített sejtválasz **I.** Az ösztrogén szignál klasszikus mechanizmusának tekintett közvetlen genomai jelátviteli út elősegíti a célgén-expressziót azáltal, hogy az E2-ER komplex közvetlenül az ERE-hez kötődik. **II.** Közvetett genomai jelátviteli út esetén az E2 által aktivált ER-ok fehérje-fehérje kölcsönhatáson keresztül kötik meg a DNS-t a transzkripciós faktorok (TF) segítségével a TF RE-hez (Transzkripciós Faktor Reszponzív Elem) kötődve. **III.** A nem genomikus jelátviteli út azzal kezdődik, hogy az E2 kötődik a sejtmembránon elhelyezkedő ER-okhoz, ami különböző protein-kináz kaszkádok aktiválódását eredményezi. A transzkripciós faktorok foszforilációja miatt megváltozhat a génexpresszió. **IV.** A ligandumfüggetlen jelátviteli út ER-aktivációt és célgén-transzkripciót okoz az ER-ok vagy a hozzájuk kapcsolódó koregulátorok foszforilációjával (P- foszfát csoport) (Vrtačnik et al., 2014)

3.3. Arzén

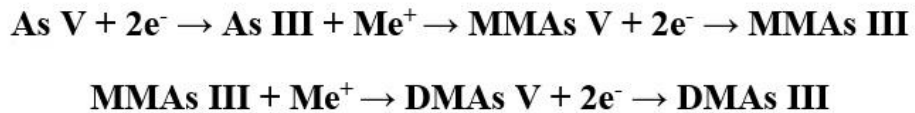
3.3.1. Az arzén, mint endokrin diszruptor

Az arzén (As) természetes formában előfordul a földkéregben, a talajban, a talajvízben és a növényekben. Bizonyos ipari folyamatok során, mint például a színesfémek olvasztása és fosszilis tüzelőanyagokból történő energiatermelés folyamán az arzén kikerül a környezetbe

(Zsarnovszky et al., 2018). Az ivóvíz arzén szennyezettsége a világ minden földrészén előfordul. Ahogy az emberi tevékenységből eredő arzénkibocsátás folyamatosan növekszik, az arzén egyre jobban felhalmozódik a környezetben. Az arzén félvezetők, ólomötvözetek (lőszeres, autóakkumulátorok) ipari felhasználásából, valamint a mezőgazdasági felhasználásból (herbicidok, peszticidok és rovarirtók összetevőjeként) és faanyagvédő szerekből származik (Watson & Yager, 2007; Vromman et al., 2014).

3.3.2. Az arzén metabolizmusa

Az As toxicitása a kémiai formától és oldhatóságtól függ, továbbá állatfajonként, illetve az alkalmazás módjától függően változik (Vromman et al., 2014). A szerves arzén a háromértékű arzenit (As III) és az ötértékű arzenát (As V) formájában létezik. Inkorporációt követően emberben az arzenát redukálódhat arzenitté, ez oxidatív módon metileződhet monometil-arzenáttá (MMAs V). A MMAs V redukálódhat monometil-arzenitté (MMAs III), ami metileződhet dimetil-arzenáttá (DMAs V), amely dimetil-arzenitté (DMAs III) redukálódhat (2. Ábra). A metilezési lépésekért az arzenit-metil-transzferáz (AS3MT) enzim felelős.



2. Ábra - Az arzén metabolizmusa A „+ 2e⁻” a redukálást, a „+ Me⁺” a metilezést jelöli.

3.3.3. Az arzén hatásmechanizmusa

Általánosságban elmondható, hogy az As III mérgezőbb, mint az As V, a szerves formák pedig mérgezőbbek, mint a szerves formák (Li et al., 2005). Az As III erős E2-szerű aktivitással rendelkezik, mivel az ER α ligandumkötő doménjához kapcsolódik, ezáltal képes stimulálni a sejtnövekedést és az ösztrogén rezponzív gének expresszióját. Az arzenátnak nincs közvetlen hatása az endokrin rendszerre, azonban arzenit többletként funkcionál, mivel enzimatikusan átalakulhat arzenitté (Romagnolo et al., 2016).

3.3.4. Az arzén a szervezetben

A krónikus As expozíció összefügg a bőr, a tüdő, az emlő és a hólyag rákos megbetegedéseivel. Állatkísérletek eredményeképp bebizonyosodott, hogy az anyai szervezet

arzén expozíciója során az utód szervezetében As vagy karcinogén anyagként viselkedik, vagy fokozza az utódokban az utólag adott egyéb szerek által kiváltott karcinogén reakciót, ezáltal felnőttkorban daganatokat indukál (Tokar et al., 2011).

Erős ED-ként a szív- és érrendszeri betegségek és a 2-es típusú diabétesz kialakulását is elősegíti, továbbá megzavarja az ivarmirigy, a mellékvese és a pajzsmirigy működését is (Davey et al., 2007; Muñoz et al., 2015). Az arzén szerepét számos reprodukzív rendellenességben is jelezték (Sengupta et al., 2015).

Az arzén idegrendszerre gyakorolt toxikus hatásait az ivóvíz magas arzénkoncentrációja esetén láthatjuk, ami főleg szándékos vagy öngyilkossági mérgezések során fordulnak elő (Vromman et al., 2014). Az arzén expozíció idegfejlődési zavarok sokaságához vezet (Rodríguez-Barranco et al., 2013). Gyermekeknél az arzén expozíció a kognitív funkciók károsodását okozhatja: viselkedés-, valamint figyelemzavarokat és tanulási nehézségeket idézhet elő (Wasserman et al., 2011).

A legújabb epidemiológiai vizsgálatok szoros összefüggést mutatnak a prenatális arzén expozíció és az azt követő gyermekkori légúti fertőzések, valamint a felnőttkori légúti megbetegedések megnövekedett prevalenciája között, jóval az arzén szisztémás eltávolítása után is (Hsu et al., 2020). Ezenkívül az arzén expozíció hozzájárul olyan egészségkárosító hatásokhoz, mint például a vázizomgyengeség, mobilitási zavarok és az izmok anyagcseréjének károsodása (Anguiano et al., 2020).

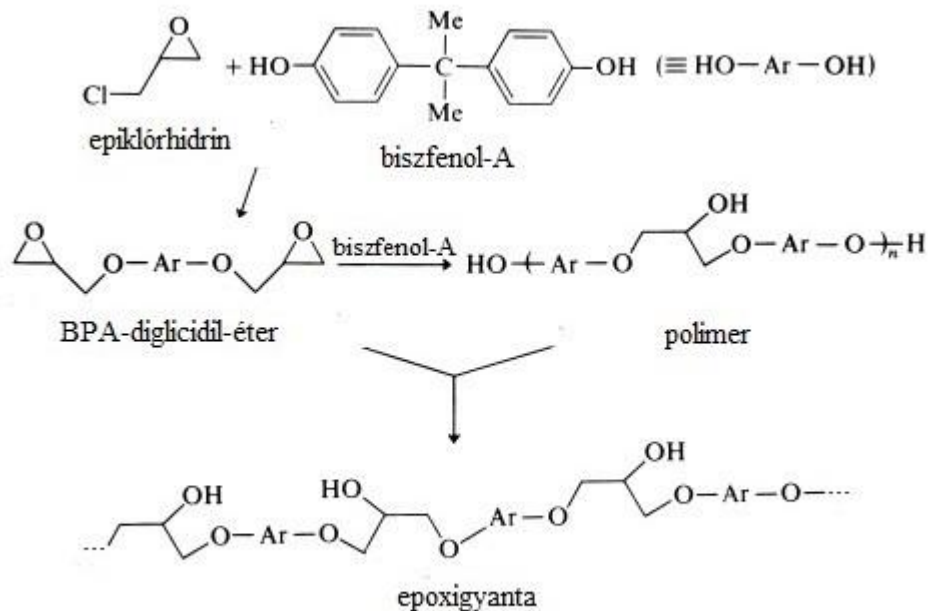
3.4. Biszfenol-A

3.4.1. A biszfenol-A, mint endokrin diszruptor

A biszfenol-A (BPA) a műanyaggyártás során keletkező melléktermék. A BPA a polikarbonát műanyagok komponense, amikből gyakran készülhet olyan tároló eszköz, amiben élelmiszer és ital is tárolható. A BPA az epoxigyanták egyik alkotóeleme is, amely anyagokkal az élelmiszerek és italok tárolására használt konzervdobozokat bélelik (Rubin, 2011). Ezen vegyület rengeteg más termékben is megtalálható volt, amelyekkel nap mint nap kapcsolatba kerülhettünk, mint például az újra felhasználható vizes palackokban, műanyag étkezészetekben, cumisüvegekben, CD-kben, DVD-kben, elektronikus berendezésekben, gépjárművekben és az újrahasznosított papírokban (Vandenberg et al., 2010; Rubin, 2011; Tassinari et al., 2020). BPA származékok egyes fogászati anyagokban, például a fogtömésekben is megtalálhatóak, emiatt folyamatosan oldódnak a nyálba, és jutnak be az emberi szervezetbe, ezáltal elhúzódó krónikus

toxinforrásként viselkednek (Fleisch et al., 2010). Kevésbé tanulmányozott expozíciós forrás a hőérzékeny papír - ami maga a vásárlás során kiállított nyugta -, amivel naponta számos ember kerül kontaktusba szupermarketekben, bankautomatákban, benzinkutakon és egyéb vásárlói létesítményekben (Ehrlich et al., 2014).

A fémes étel- és italdobozokat az epoxigyanták belső bevonatként védik a rozsdásodástól és a korróziótól. Ezen gyanták közül sok szintéziséhez a BPA-nak epiklórhidrinnel történő kondenzációjára van szükség a BPA-diglicidil-éter előállításához. A térhálósított szerkezetű hőre lágyuló műanyagok olyan folyékony gyantából készülnek, amelyek BPA-diglicidil-éter és egy polimer keverékéből állnak (3. Ábra). A folyékony gyantát térhálósító reagenssel keverik össze, – amely lehet sav, di- vagy polialkohol vagy di- vagy poliamin – amelynek hatására a gyanta megkeményedik.



3. Ábra - Az epoxigyanták gyártásának főbb lépései. A biszfenol A-t epiklórhidrinnel kondenzálják, majd a keletkező BPA-diglicidil-étert biszfenol-A-val reagáltatják, ezáltal egy polimer jön létre. Az epoxigyanta a BPA-diglicidil-éter és az ábrán látható polimer keveréke.

Ha nem teljes a polimerizáció, a maradék BPA kimosódhat az epoxigyantából. A magas hőmérséklet és a savas vagy lúgos oldatoknak való kitettség szintén növelheti a BPA kimosódását a bevonatokból és műanyagokból, még akkor is, ha a polimerizáció folyamata teljes volt (Lewars, 1984; Vandenberg et al., 2010).

3.4.2. A biszfenol-A metabolizmusa és hatásmechanizmusa

A BPA-expozíció fő útja a szájon át történő felvétel (mint élelmiszer- és ivóvíz-szennyező anyag), de a bőrön keresztül is felszívódik, inkorporációt követően metabolizálódik és vizelettel ürül a szervezetből (Rubin, 2011). A BPA-t először gyenge ösztrogén utánzó anyagnak tekintették minimális egészségügyi kockázattal. Később receptor-ligand kapcsolatot vizsgáltak, amelynek eredményei azt mutatták, hogy még kis koncentrációkban is (0,2 – 0,002 ng / ml között) kötődik az ER α és az ER β receptorokhoz, ezáltal számos különféle intracelluláris utat és sejtreakciót befolyásolhat (lásd 1. Ábra). A BPA az energiaháztartást is befolyásolja, így közvetetten hatva a sejtek működésére. Nemcsak az ER kifejeződésre lehet hatással, hanem több sejtfejlődést szabályozó receptorára is, ami szintén számos károsodást eredményezhet (Jocsak et al., 2019).

3.4.3. A biszfenol-A az állati szervezetben

A BPA a szervezetbe jutva a már korábban említett ER α és ER β receptorokhoz kötődik és kémiai szerkezetének köszönhetően ösztrogén receptorokat befolyásoló hatással rendelkezik. Ezáltal az akut BPA-expozíció számos szaporodásbiológiai rendellenességhez köthető: előrehaladott pubertás, petefészek-rendellenességek, ösztrusz ciklus megváltozása, prosztatamegnagyobbodása, valamint a sperma minőségének és mennyiségének csökkenése (Maffini et al., 2006). A női szervezetben a terhesség alatt emelkedett BPA-szint a vetélések és a koraszülések megnövekedett előfordulását idézheti elő (Rubin, 2011). A BPA kimutatható az anyai (0,3–18,9 ng / ml) és a magzati (0,2–9,2 ng / ml) szérumból is, bizonyítva, hogy a BPA képes átjutni a placentán. A BPA a magzatvízben körülbelül az ötszörösére koncentrálódik a terhesség korai szakaszában, ami további jelentős magzati expozíciót jelent a prenatális fejlődés fontos periódusaiban. A BPA-koncentráció rágcsálókban károsítja a reprodukív működést, az idegfejlődést és a szinapszisok képződését a hippocampusban (Zsarnovszky et al., 2018).

A vizeletben előforduló magas prenatális és/vagy gyermekkori BPA koncentráció összefügg a gyermekek bizonyos szociális és érzelmi viselkedésével, például a fokozott aktivitással, agresszióval és a gyenge érzelmi kontrollal. Állatoknál korai életkorban a BPA expozíció elősegíti a társas viselkedés és interakciók kialakulását, továbbá fokozza a szorongás és az agresszió mértékét. A BPA befolyásolja az anyai viselkedést is, a fokozott BPA expozíció csökkenti az anyai utódgondozás mértékét (Kundakovic et al., 2013; Wolstenholme et al., 2013).

A BPA befolyásolja az androgén- és a pajzsmirigyhormonok szabályozását is, ezáltal káros hatással van a vérben lévő pajzsmirigyhormonok szintjére, amely hormonok szintén fontos szerepet játszanak a szexuális fejlődés során (Tassinari et al., 2020). A megnövekedett BPA-expozícióval járó egészségügyi szövődmények közé tartozik a 2-es típusú cukorbetegség (az alacsony BPA-szint gátolja az emberi zsírszövetből származó adiponektin felszabadulását), továbbá növeli a szív- és érrendszeri betegségek kialakulásának kockázatát. A BPA expozíció hatással van az immunrendszerre is; a BPA expozíció egerekben fokozott citokin- és antitest termeléssel, valamint a T-sejtek számának csökkenésével jár. Az emberi szervezetben a vizelet BPA szintjének emelkedése fokozhatja az asztma kialakulásának kockázatát (Krementsov et al., 2013).

3.5. Zearalenon

3.5.1. A zearalenon, mint endokrin diszruptor

A zearalenon (ZEA) vagy másnéven F-2 mikotoxin egy erős, nem szteroid jellegű mikoösztrógen, amelyet egyes *Fusarium* penészgombafajok (*F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. equiseti* és *F. crookwellense*) termelnek világszerte. Ezen gombafajok már a termőterületen megfertőzhetik a gazdanövényt, főképp a kukoricát. A takarmány nem megfelelő tárolása is kedvez a gombák elszaporodásának, illetve -toxintermelésének, ugyanis a magas hőmérséklet és nagy nedvességtartalom mellett is elszaporodhatnak a gabonán. A ZEA mikotoxinokkal együttesen előfordulhat például a dióban, a kukoricában, a rizsben és számos más gabonafélében.

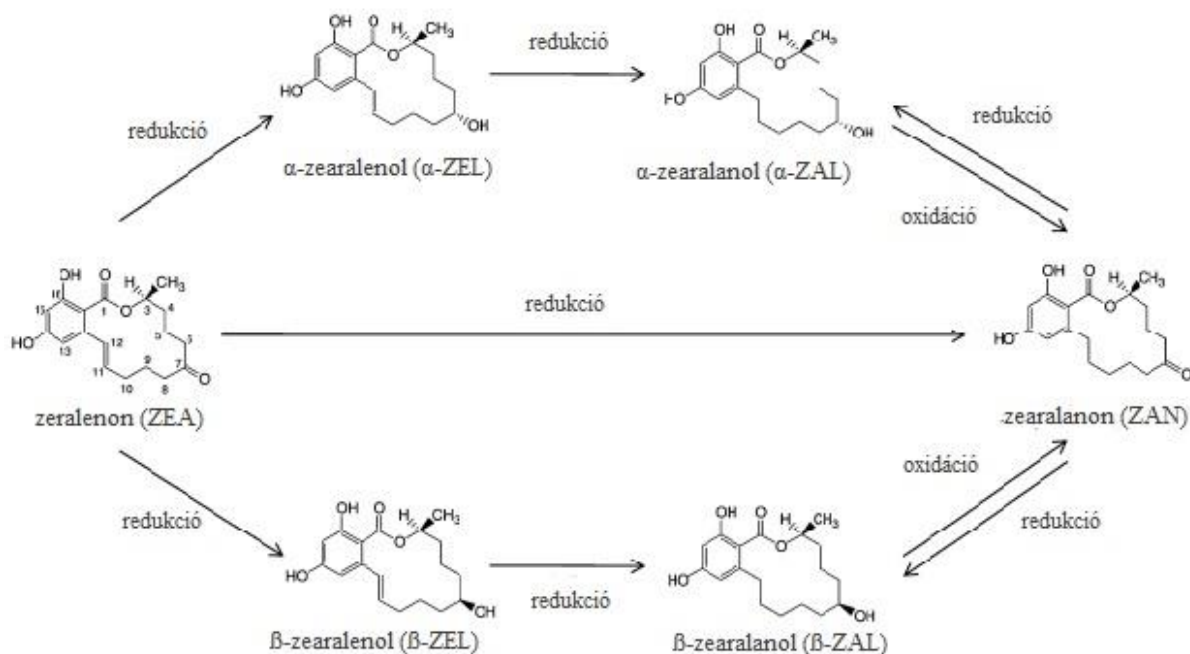
A ZEA az emberek szervezetébe közvetlenül mikotoxinnal kontaminált táplálék felvételével vagy közvetetten mikotoxinnal kontaminált takarmányt elfogyasztó gazdasági haszonállatok termékeinek (tej, hús, tojás) elfogyasztásával jut be (Maragos, 2010; Zhu et al., 2015; Kowalska et al., 2016; Kiss et al., 2018).

A ZEA stabil vegyület, szokásos főzési hőmérséklet alatt nem bomlik le, magas hőmérsékleten pedig csak részben eliminálódik (Castelo et al., 1998). Mivel bizonyos élelmiszerek gyártási folyamatai során a toxin nem bomlik le, így az egész emberi táplálékláncot számos élelmiszerterméken keresztül érinti, beleértve a gabonaféléket, húst, tejet, bort, sört, szárított gyümölcsöket és a fűszereket (Kriszt et al., 2012). A ZEA a *Fusarium graminearum* penészgombával szennyezett ivóvízben is megtalálható (Pfeiffer et al., 2011).

3.5.2. A zearalenon metabolizmusa

A ZEA orális felvételt követően gyorsan felszívódik, majd a bélsejtek (Shin et al., 2009) és a hepatociták (Molina-Molina et al., 2014) által metabolizálódik. Két fő ZEA biotranszformációs útvonal létezik:

1) a hidroxilezés, amelynek eredményeként a ZEA-ból 7-keton redukcióval két sztereoizomer metabolit, az α -zearalenol és a β -zearalenol (α -ZEL és β -ZEL) képződik, amelyet 3 α - és 3 β -hidroxiszteroid-dehidrogenáz (HSD) enzim katalizál (Minervini & Aquila, 2008; Molina-Molina et al., 2014). Ezekből további redukció során (11–12 kettős kötésű redukció) két kisebb metabolit, α - és β -zearalanol (α -ZAL és β -ZAL) jön létre. Egy másik redukciós út a ZEA-t zearalanonná (ZAN) alakítja, ami tovább redukálható α -ZAL-ra és β -ZAL-ra (Molina-Molina et al., 2014) (4. Ábra). Az előbb említett ZEA-származékok kimutathatók *Fusarium* penészgombával fertőzött kukoricaszárakban és a rizsföldeken (Zinedine et al., 2007). A ZEA öt metabolitja a ZEA-val kontaminált takarmány elfogyasztása után az állati és az emberi szervezetben hosszú ideig perzisztálnak, ezáltal ott hosszán kifejthetik hatásukat (Nakamura & Kadokawa, 2015).



4. Ábra - A ZEA és metabolitjainak kémiai szerkezete és metabolikus útjai. A zearalenonból redukcióval két metabolit, az α - és β -zearalenol (α - és β -ZEL) képződik, amelyekből további redukció során α - és β -zearalanol (α - és β -ZAL) képződik. Egy további redukciós út a ZEA-t zearalanonná (ZAN) alakítja, amely további redukció során α - és β -ZAL-lá alakítható.

2) A ZEA és redukált metabolitjai glükuronsavhoz vagy szulfonsavhoz konjugálódnak, ösztrogénszerű hatásukat elvesztik, majd 4-5 nappal később a vizelettel kiválasztódnak (Molina-Molina et al., 2014; Pack et al., 2020). A ZEA-t és redukált metabolitjait az uridin-difoszfát-glükuronil-transzferáz (UDPGT) enzim konjugálja glükuronsavval (Minervini & Aquila, 2008).

A ZEA és két fő metabolitja az α -ZEL és a β -ZEL alacsony koncentrációban megtalálhatók a szójalisztnak, továbbá a kukorica melléktermékekben, mint például a kukoricaszilázsban (Zinedine et al., 2007). A szervezetbe kerülve a ZEA és metabolitjai ösztrogén receptorokat befolyásoló hatással rendelkeznek az állati szervezetben, ezen vegyületek a májban, a méhben, az emlőmirigyben és a hipotalamuszban lévő ösztrogén receptorokhoz kötődnek (Bryden, 2012).

A ZEA iránti érzékenység fajspecifikus, ami annak köszönhető, hogy a ZEA metabolikus átalakulásának sebessége α - és β -zearalenollá állatfajonként változó (Dong et al., 2010). A α -ZEL ösztrogénszerű aktivitása a célszertől függően 3–100-szor magasabb, mint a ZEA-é, ennek következtében sokkal toxikusabb, mint a ZEA. A β -ZEL aktivitása nagyságrendekkel alacsonyabb, mint a ZEA-é, így gyakorlatilag ártalmatlan (Dong et al., 2010; Rogowska et al., 2019). A ZEA és két fő metabolitja csak valamivel kisebb ösztrogén hatékonyságot mutatnak, mint maga a 17β -ösztradiol (Zsarnovszky et al., 2018). Ezen anyagok ER-okhoz való kötődésének erőssége nagyjából a 17β -ösztradiol kötődési erejének huszada (Kuiper-Goodman et al., 1987).

3.5.3. A zearalenon az állati szervezetben

Az ösztrogén receptorokhoz kötődve a ZEA erős ösztrogénszerű hatással rendelkezik, ezért a reproduktív rendszerrel kapcsolatos rendellenességek kialakításában vehet részt; károsíthatja a termékenységet; csökkentheti a termékenyülés esélyét, növelheti a halvaszületések számát és kóros magzati fejlődést idézhet elő haszonállatokban (Zinedine et al., 2007; Dong et al., 2010; Kiss et al., 2018).

Abbasian és mtsai. (2018) patkányokon végzett kísérletek eredményei alapján megállapították, hogy a hosszú távú ZEA expozíciónak kitett patkányokban megnőtt a PCOS (policisztás ovárium szindróma) kifejlődésének esélye. Pang és mtsai. (2017) által végzett vizsgálatok eredményei kimutatták, hogy a ZEA alacsony koncentrációjának hosszú távú expozíciója a hím egerek reprodukciós képességének megzavarásához vezethet. Wang és mtsai.

(2013) arról az eredményről számoltak be, hogy a ZEA vemhes egerekben növeli a magzati felszívódás és a koraszülés előfordulásának mértékét. A káros hatások mellett jótékony hatása is lehet a ZEA-nak, például pozitívan hat a neurogenesisre, ezáltal javítva a vizsgált egerek és a patkányok memóriáját (Kowalska et al., 2016).

A ZEA expozíció sertéseknél hiperösztrogenizmust idézhet elő, amely régóta problémát jelent az állattenyésztésben. A hiperösztrogenizmus tipikus jelei a hosszan tartó ösztroz, anösztroz, megváltozott libidó, meddőség, az álvemhesség megnövekedett előfordulása, valamint a tőgy vagy az emlőmirigy fokozott fejlődése és a rendellenes laktáció. ZEA expozíció hatására gyakrabban fordulnak elő olyan különböző kórképek, mint a koraellés, vetelés, tőgygyulladás, vulvovaginitis és a rektális vagy hüvelyi prolapsusok (Kuiper-Goodman et al., 1987). A ZEA-nak való kitettség hatására kocsasüldőkben megnövekedett a reproduktív szervek mérete, a ZEA dózisfüggő módon indukálta méhtest simaizmainak hiperpláziáját és csökkentette a petefészekben lévő tüszők számát (Kowalska et al., 2016). Ráadásul a ZEA beadása a vemhesség kritikus periódusában (35. és 70. nap között) a koca alacsonyabb testsúlyával társult, és hatással volt a születendő malacok számára, illetve testtömegére (Zhang et al., 2015).

A baromfi - különösen a csirkék -, meglehetősen ellenállóak a ZEA hatásaival szemben (Kuiper-Goodman et al., 1987), ugyanakkor ha a tojó a takarmánnyal felveszi a ZEA-t, a tojásában a ZEA felhalmozódhat (Zhu et al., 2015).

Szarvasmarhánál és juhoknál a ZEA expozíció növeli a reprodukciós rendellenességek kialakulásának kockázatát (Rogowska et al., 2019). Teheneknél a ZEA expozíció hatására gyakrabban fordulnak elő különböző kórképek, mint például a meddőség, tejtermelés csökkenése és a hiperösztrogenizmus (Zinedine et al., 2007). Nakamura és mtsai. (2015) arról a kísérleti eredményről számoltak be, hogy a ZEA modulálhatja a hipofízis elülső lebenyében található sejtek LH-termelését szarvasmarhában. Kérődzőknél a ZEA expozíció csökkentette a sejtproliferációt és a génexpresszió mértékét, azonban fokozta a granulóza sejtek növekedését.

A zearalenon káros hatásai az emberi szervezetben is ismertek: a ZEA az emberi szervezetbe jutva genotoxikus, immunotoxikus, teratogén, karcinogén és hematotoxikus hatással rendelkezik (Rogowska et al., 2019). Cao és mtsai. (2019) *in vitro* kísérleteik során arról az eredményről számoltak be, hogy a ZEA erős embrionális toxicitást mutat, apoptózist és oxidatív stresszt indukál az emberi embrionális őssejtekben.

A fent említett endokrin diszruptorok inkorporációt követően - kémiai szerkezetüknek köszönhetően - az ER α és ER β receptorokhoz kötődhetnek. Ezen receptorokon agonista vagy antagonisták hormonhatást válthatnak ki. Az ösztrogén receptorok a szervezetben számos

szervben megtalálhatóak, azonban az ED-k leginkább a reproduktív- és endokrin szervekre, továbbá az ezeket szabályozó központi idegrendszeri struktúrákra vannak káros hatással. Mivel ezen szervek a hipotalamusz-hipofízis-gonád tengelyen keresztül igen szoros kapcsolatban állnak egymással, ezáltal szervezet teljes neuroendokrin rendszerének működése károsodhat, ha a szabályozás akár csak egy ponton is módosul, a hormonális és a feedback szabályozás eredményeképp.

4. Célkitűzések

Kísérleteink során az As, a BPA és a ZEA, mint endokrin diszruptorok ösztrogén alfa és -béta receptorok mRNS expressziójára kifejtett hatását vizsgáltuk patkány és egér modellen. A vizsgálatok folyamán feltételeztük azt, hogy az ismert endokrin diszruptorok hatása nemcsak nagyságrendben tér majd el a két állatfajban, hanem ezek a szerek által az ER α és ER β receptorokra kifejtett gátló- illetve stimuláló hatás a két vizsgált modellben el is térhet. Ahhoz, hogy az előbb említett szerek hatását vizsgálni tudjuk, a kutatás során patkányból és egerekből származó kisagyi szemcsesejt kultúrákat állítunk elő, kezeltük a korábban említett ED-okkal, majd qRT-PCR vizsgálatot végeztünk az ER α és ER β mRNS expresszió szintjének meghatározásához.

5. Anyag és módszer

5.1. Állatok

A Sprague-Dawley törzsbe tartozó kísérleti patkányokat a TOXI-COOP Zrt.-től (Budapest, Magyarország), a C56BL/6 egereket a Magyar Tudományos Akadémia Biológiai Kutatóközpontjától (Szeged, Magyarország) vásároltuk és az anyaállatokat az Állatorvostudományi Egyetem Élettani és Biokémiai Tanszékén (Budapest, Magyarország) tartottuk és szaporítottuk. A vemhes patkányok és egerek a várható ellés előtt legalább 4 nappal korábban érkeztek a tanszék állatházába. Az anyaállatokat standard laboratóriumi körülmények között tartottuk: a vízhez és élelemhez *ad libitum* férhettek hozzá, mesterséges fénnel 12 órás fény és 12 órás sötét ciklust biztosítottunk számukra. A levegő hőmérséklete 24-25 °C, -páratartalma 55-60% volt, továbbá az állatházban óránként 17-szer történt levegőcsere. Az állatok huzat és zaj ellen védve voltak (ultrahangos, illetve emberi hallási tartományban egyaránt). Az utódok születését önkényesen a 0. posztnatális napnak jelöltük ki. Az állatokat az 1986. november 24-i EK Tanács irányelveinek (86/89/EGK) figyelembevételével kezeltük. Az összes eljárás a helyi etikai bizottság jóváhagyásával és felülvizsgálatával történt (a kísérleteket az ÁTE Munkahelyi Állatkísérleti és Állatvédelmi Bizottsága és a regionális állatjóléti hatóság engedélyezte, az engedély száma: PE/EA/1252-6/2016, Pest Megyei Kormányhivatal).

5.2. Reagensek és anyagok

A táptalajokat (Dulbecco's modification of Eagle's medium [DMEM], Ham's F-12 50/50 mix) és a TRI reagenst az Invitrogéntől vásároltuk (Carlsbad, CA, USA). Penicillin/sztreptomycin és a hővel inaktivált magzati szarvasmarha szérumot a GIBCO-tól rendeltük (Budapest, Magyarország). A citozin β -D-arabinofuranozidot (CAS: 147-94-4), a ZEA-t (tisztaság: $\geq 99\%$; CAS:17924-92-4), a BPA-t (tisztaság: $\geq 99\%$; CAS: 80-05-7) és a nátrium-meta-arszenitet (tisztaság: $\geq 90\%$; CAS:7784-46-5) a Sigma-Aldrich-től (Budapest, Magyarország) vásároltuk.

5.3. Sejtkultúrák előállítása

A primer kisagyi szemcsesejt kultúrát egy korábban leírt (Wong et al., 2001) metódus alapján készítettük el, néhány módosítással kiegészítve. A Sprague-Dawley patkányok kisagyt 7-9

napos korban, a C56BL/6 egerek kisagyát 6 napos korukban távolítottuk el dekapitálást követően. Mivel a korábbi kutatások és jelen kutatás során sem figyeltünk meg nemi különbségeket, így a kísérletben hím és nőstény nemű állatokat egyaránt felhasználtunk. Az eltávolított kisagyat enzimátikus emésztés nélkül homogenizáltuk, ezután a sejteket egy nejlon sejtszűrő (pórusméret: 40-70 μm) segítségével szűrtük át, hogy a nagyobb sejt agglomerátumokat eltávolítsuk. A sejteket poli-L-lizinnel bevont Petri-csészékbe (sejtsűrűség: 2300-2700 sejt/ mm^2) ültettük ki, majd a kapott sejt kultúrát 5-7 napig inkubáltuk 37 °C-on, 5% CO_2 -dal, szérum- és szteroidmentes környezetben (DMEM). A sejt kultúra fenntartása és a neuronok enyhe depolarizációja érdekében 5 $\mu\text{g/ml}$ inzulint, 5 $\mu\text{g/ml}$ transferrint, 5 $\mu\text{g/ml}$ szelént és 20 mM KCl-ot adtunk a táptalajhoz. Azért, hogy gátoljuk az idegsejteken kívüli egyéb sejtek szaporodását, 24 órával a kioltás után 10 μM citozin β -D-arabinofuranozidot adagoltunk a kultúrához. Az eredmény: a sejt kultúrák nem csoportosuló szemcsesejteket tartalmaztak (~95%).

5.4. Kezelések

Az egérből származó sejt kultúrát 5 napon, a patkányból származó sejt kultúrát 7 napon kezeltük 6 órán át, a sejtek begyűjtése előtt az alábbi endokrin diszruptorokkal: As $2,5 \times 10^{-7}\text{M}$, BPA 10^{-10}M , ZEA 10^{-10}M , majd a sejteket eltávolítottuk. Az endokrin diszruptorok mennyiségét az alkalmazott idegsejti sejt kultúra érzékenysége, valamint a korábbi kísérleteink alapján választottuk meg, amelyek során meghatároztuk az endokrin diszruptorok leghatékonyabb dózist (Wong et al., 2003; Zsarnovszky et al., 2005). BPA és ZEA esetében vivőanyagként 0,1 % dimetil-szulfoxid (DMSO) oldatot használtunk, mivel ebben a koncentrációban nincs hatása a sejt kultúrákra. A kontroll mintákat nem kezeltük ED-okkal. Az egyes kezeléseket legalább ötször megismételtük.

5.5. Reverz-transzkripció és kvantitatív-RT-PCR

A patkány és egér sejt kultúrából TRI reagens segítségével a gyártó protokollja szerint kinyertük az összes (totál) RNS-t és direkt-zol RSN miniprep kittel (Zymo Research, Irvine, CA 92614, USA) megtisztítottuk azt. Az RNS integritását etídium-bromid festéssel, OD260/OD280 nm-en (abszorpciós arány $> 1,85$), elektroforetikusan ellenőriztük. 3 μg totál RNS-t M-MLV reverz transzkriptáz enzim (Promega Corporation) hozzáadásával és oligo-dT-primerekkel 30 μL -re kiegészítve RT-PCR segítségével ártunk. A kapott cDNS mintákat felhasználásig $-80\text{ }^\circ\text{C}$ -on tároltuk. Később a cDNS-ből 2 μL -t három példányban, egér sejt kultúra esetében

glicerinaldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (Gadph), patkány sejtkultúra esetében Béta-aktin segítségével qRT-PCR-rel (Master SYBR Green, Hoffmann-La Roche, Basel, Svájc), LightCycler 2.0 F. készülékben analizáltuk. Az előbb említett anyagok endogén kontrollként szolgáltak a kísérleti adatok normalizálásához. Azok a primer szekvenciák, amiket egérnél és patkánynál használtunk, egy korábbi publikációban megtalálhatók (Jocsak et al., 2019). A PCR hőmérsékleti ciklusok paraméterei a következők voltak: 1 ciklus 95 °C-on 30 másodpercig (denaturáció), 45 ciklus 72 °C-on 15 másodpercig (amplifikáció), 1 ciklus 70 °C-on 1 percig (annealing temperature: izzítási hőmérséklet, ez a primerek tapadási hőmérséklete) és végül 1 ciklus 40 °C-on 30 másodpercig (lehűtés). Az amplifikált termékek beazonosítása agaróz gélelektroforézissel, olvadáspont- és szekvencia analízissel történt. A valós idejű PCR küszöbértékét (threshold cycle: Ct) a REST-XL szoftver 2.0 verziójának (GenEx-BioMcc, TUM, München, Németország) felhasználásával határoztuk meg és normalizáltuk Gaphd-re és β -aktinra. Az mRNS relatív expressziós arányait a $2^{-\Delta\Delta C_t}$ képlet alkalmazásával determináltuk.

5.6. Adatelemzés, statisztika

Az összes bemutatott adat reprezentálható és legalább három egymástól független mérésből készült. A statisztikai analízist az ÁTE Biomatematikai Tanszék segítségével, kétutas ANOVA-val majd Bonferroni korrekcióval és/vagy párosítatlan T-próbával készítettük el, Excel (Microsoft, Microsoft Co., Redmond, WA, USA) és GraphPad Prism version 4 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) segítségével.

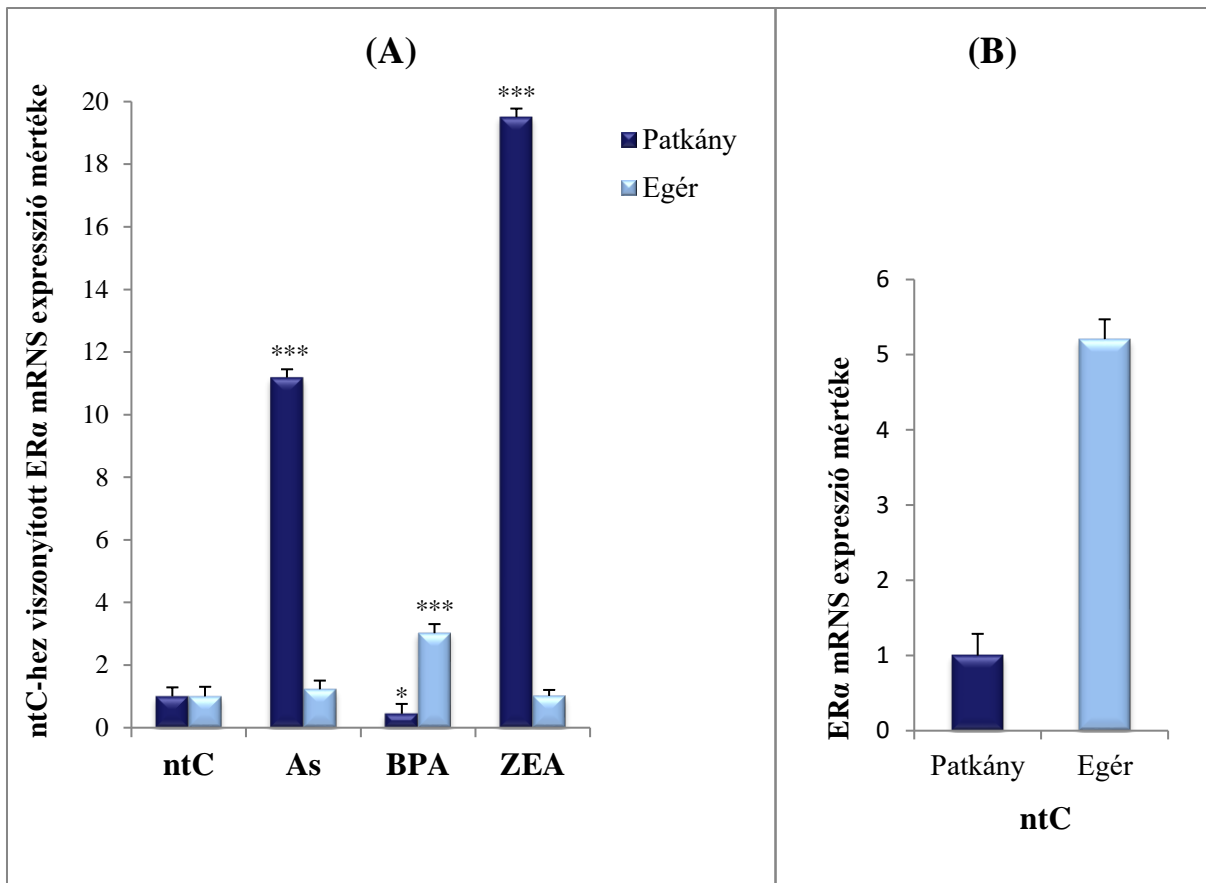
6. Eredmények

6.1. ER α mRNS expresszió változása a kezelések hatására

Patkányból, illetve egérből származó kisagyi szemcsesejt kultúrákat állatfajonként három csoportra osztottuk, majd a csoportokat külön-külön három egymástól eltérő endokrin diszruptorral (As, BPA, ZEA) kezeltük. Ezt követően az adott ED-hoz és modellhez tartozó ER α receptor expressziójának mennyiségi meghatározását végeztük el. Az alábbi táblázatban, valamint ábrán az arzénal, biszfenol-A-val és zearalenonnal kezelt patkány és egér sejt kultúrák ER α mRNS expressziójának szintjeit láthatjuk (1. Táblázat, 5. Ábra). Patkány kontroll mintákban (non-treated controls, „ntC”) az ER α relatív expresszióját β -aktinra, míg egér kontroll mintákban az ER α relatív expressziós szinteket Gapdh-ra normalizáltuk. Az egér ER α mRNS szintje ($5,21 \pm 0,26$) szignifikánsan magasabb eltérést eredményezett, mint az ennek megfelelő patkány mintáé ($1,00 \pm 0,29$). Patkány kisagyi szemcsesejtekben az arzénal kezelt csoport az ER α mRNS szintjének szignifikáns növekedését eredményezte ($11,19 \pm 0,26$) a kontroll csoporthoz képest ($p < 0,001$). Az „ntC” mintákhoz viszonyítva ZEA alkalmazásának eredményeként az ER α mRNS expresszió jelentősen emelkedett ($p < 0,001$) patkány modellben, hasonlóan, mint As esetében, azonban az expresszió növekedésének mértéke még magasabb volt ($19,51 \pm 0,27$). Egér kisagyi szemcsesejtekben - a patkány sejt kultúrákkal ellentétben -, az As és a ZEA esetében nem találtunk bizonyítékot arra, hogy az előbb említett ED-oknak lenne hatása az mRNS expresszióra. Patkány sejt kultúrában BPA kezelés hatására az ER α mRNS expressziója szignifikánsan csökkent ($0,45 \pm 0,31$) ($p < 0,05$), ezzel szemben az egér idegsejtenyészetben a BPA növelte az ER α mRNS expresszió szintjét ($3,02 \pm 0,29$) ($p < 0,001$).

	Patkány	Egér
ntC	$1,00 \pm 0,29$	$5,21 \pm 0,26$
As	$11,19 \pm 0,26$	$1,23 \pm 0,28$
BPA	$0,45 \pm 0,31$	$3,02 \pm 0,29$
ZEA	$19,51 \pm 0,27$	$1,01 \pm 0,19$

1. Táblázat A kezeletlen kontrollokhoz viszonyított ER α gén relatív expressziós értékei és szórásai patkány és egér modellben.



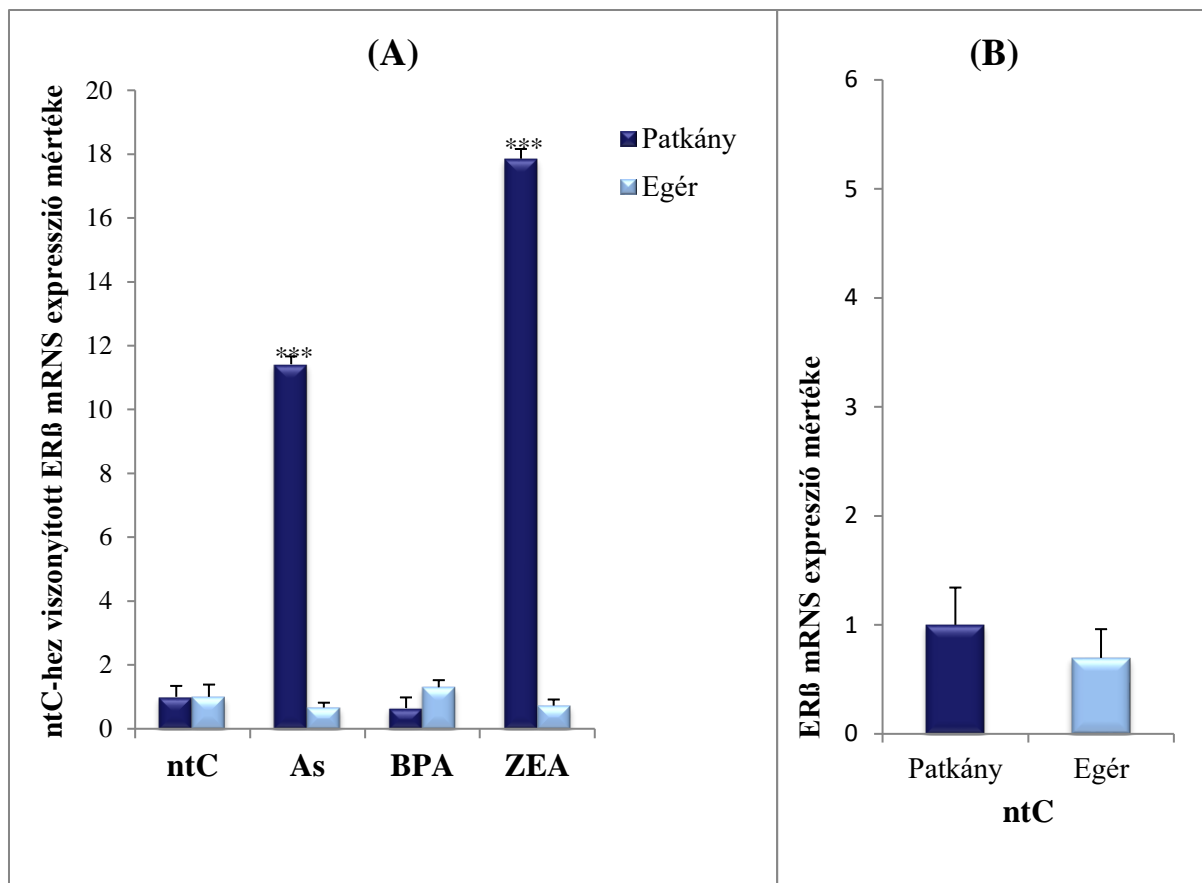
5. Ábra - ER α mRNS expressziója patkány és egér kisagyi szemsesejtekben, amelyeket arzénal, biszfenol-A-val vagy zearalenonnal kezeltünk. (A) Az ER α gén relatív expressziós szintjei, amit qRT-PCR módszer segítségével detektáltunk, majd patkány esetében β -aktin, egér esetében Gapdh kontroll gén átlagához normalizáltunk. A megjelenített p-értékeket (* p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001) a nem kezelt kontrollokhoz (ntC) normalizáltuk, emiatt az ntC érték az „1”. **(B)** A patkány és egér ntC-hez viszonyított ER α mRNS expresszió mértéke, amelyet patkány esetében β -aktinra, egér mintákban Gapdh-ra normalizáltunk (p-értéket nem mutatjuk). Az itt feltüntetett adatok öt egymástól független kísérlet átlagos szórásának értékei (n=5 kezelésenként).

6.2. ER β mRNS expresszió változása a kezelések hatására

A 6.1. fejezetben leírt módszert alkalmazva, meghatároztuk az adott ED-hoz és modellhez tartozó ER β receptor expressziójának mennyiségét. Az ER β mRNS szintjei az „ntC” mintákban közel azonosak voltak a két rágcsálófajban, ellentétben az ennek megfelelő ER α mRNS szintekkel. Az ER β kifejeződés hasonló mintázatot mutat mindkét állatfajban, mint amit az ER α expresszió során megfigyelhettünk, de van néhány eltérés az mRNS mennyiségében. Az alábbi táblázatban, valamint ábrán az arzénal, biszfenol-A-val és zearalenonnal kezelt patkány és egér sejt kultúrák ER β mRNS expressziójának szintjeit láthatjuk (2. Táblázat, 6. Ábra). Patkány sejt kultúrákban a beadott As ebben az esetben is szignifikánsan megnövelte az ER β mennyiségét a sejtekben ($11,42 \pm 0,25$) ($p < 0,001$) a kontroll csoporthoz képest. A ZEA-val kezelt patkány csoportnál az mRNS képződés nagyobb mértékű ($17,86 \pm 0,30$) ($p < 0,001$), mint az As esetében. A BPA kezelésnek nem volt bizonyítható hatása az ER β mRNS expresszióra patkány mintákban, míg az ER α receptoroknál az mRNS mennyiség csökkent ($p < 0,05$). A patkány mintákkal összevetve az egér sejt kultúrákban az alkalmazott ED-k közül egyik sem változtatta meg az ER β mRNS expressziójának mértékét.

	Patkány	Egér
ntC	$1,00 \pm 0,34$	$0,70 \pm 0,26$
As	$11,42 \pm 0,25$	$0,67 \pm 0,15$
BPA	$0,65 \pm 0,33$	$1,30 \pm 0,22$
ZEA	$17,86 \pm 0,30$	$0,73 \pm 0,19$

2. Táblázat A kezeletlen kontrollokhoz viszonyított ER β gén relatív expressziós értékei és szórásai patkány és egér modellben.



6. Ábra - ERβ mRNS expressziója patkány és egér kisagyi szemsesejtekben, amelyeket arzénal, biszfenol-A-val vagy zearalenonnal kezeltünk. (A) Az ERβ gén relatív expressziós szintjei, amit qRT-PCR módszer segítségével detektáltunk, majd patkány esetében β-aktin, egér esetében Gapdh kontroll gén átlagához normalizáltunk. A megjelenített p-értékeket (* p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001) a nem kezelt kontrollokhoz (ntC) normalizáltuk, emiatt az ntC érték az „1”. **(B)** A patkány és egér ntC-hez viszonyított ERβ mRNS expresszió mértéke, amelyet patkány esetében β-aktinra, egér mintákban Gapdh-ra normalizáltunk (p-értéket nem mutatjuk). Az itt feltüntetett adatok öt egymástól független kísérlet átlagos szórásának értékei (n=5 kezelésként).

7. Megbeszélés, következtetések

A két állatfaj idegsejt-tenyészetének összehasonlítása során a vizsgált endokrin diszruptorok okozta hatások jelentősen különböztek az ER α és ER β mRNS expressziós szintjeiben. Az említett különbség a kezeletlen, „ntC” minták között is megfigyelhető. A kezeletlen kontrollok ER α mRNS szintjei szignifikánsan magasabb eltérést eredményeztek egér mintákban a patkány mintákhoz képest, míg az ER β mRNS szintek azonosak voltak a két modellben. Ez azt jelenti, hogy az ER α receptorok közötti alapvető szabályozás a két vizsgált fajban eltérő. Ehhez hasonló faji különbséget láthatunk egy szerotonin receptor altípus (5-HT6) esetében is. A patkányok és az emberek szubkortikális agyi struktúráiban (a dorsalis és ventralis striatumban) az 5-HT6 receptor fokozott expresszióját figyelhetjük meg, ezzel szemben az egér agyának ugyanazon régióiban az 5-HT6 receptor szintje nagyon alacsony (Ellenbroek & Youn, 2016). A patkány és egér „ntC” mintákban a relatív mRNS expressziós szinteket normalizáltuk annak érdekében, hogy kiküszöböljük az alapvető élettani fajspecifikus receptor expressziós szintek közötti különbségeket.

Patkány sejt kultúrákban az ER α mRNS expresszió magas indukcióját figyeltük meg a zearalenon kezelést követően, míg egér sejttenyészetekben a ZEA esetében nem találtunk bizonyítékot arra, hogy lenne hatása a receptor kifejeződésre. Mueller és mtsai. (2004) humán endometriális Ishikawa sejt vonalon végzett kísérleteik során megállapították, hogy a ZEA alacsony dózisban növelte a sejtmagban lévő koaktivátorok (GRIP1 és SRC-1) mennyiségét, ezáltal jelentősen fokozta az ER α receptor expressziójának mértékét. Ugyanakkor a ZEA magas dózisban antagonistaként hat mind az ER α , mind az ER β receptorokon a fent említett koaktivátorok sejtmagban lévő mennyiségének csökkentése révén. Takemura és mtsai. (2007) a ZEA és az alfa- és béta ösztrogén receptorok közötti kötődés erősségét vizsgálták humán sejt vonalon. A kutatás eredményei arra mutattak rá, hogy a ZEA nagyobb affinitással és erősebben kötődik az ER β receptorokhoz, mint az ER α -hoz. Kísérleteink során feltehetőleg ezért nem találtunk bizonyítékot arra, hogy a ZEA-nak lenne hatása az ER α receptor expresszióra egér modellben.

Az arzén - a ZEA-nál látottakhoz hasonlóan - patkány mintákban fokozta az ER α expresszió mértékét, azonban egér mintákban nem találtunk bizonyítékot arra, hogy az arzénnek lenne hatása a képződő mRNS mennyiségére. Parodi és mtsai. (2015) nőstény patkányokon végzett kísérletek eredményei alapján megállapították, hogy az As az ER α receptor ligandumkötő doménjéhez nagy affinitással kötődik, így jelentősen növeli az ER α receptor expresszió mértékét. Ugyanakkor Davey és mtsai. (2007) arról számoltak be, hogy

humán MCF-7 emlőrák sejtekben az arzénnek alacsony dózisokban nincs hatása az ER α mRNS expressziós szintekre, azonban nagyobb dózisokban az As csökkentette a képződő mRNS mennyiségét az ERE expressziójának gátlása révén.

Egér neuronokban a BPA szignifikánsan növelte a képződött mRNS mennyiségét, ezzel szemben patkány sejt kultúrákban az alkalmazott BPA csökkentette az ER α expressziót a kezeletlen mintákhoz viszonyítva. Hasonló eredményt figyelhettünk meg Xu és mtsai. (2014) patkány sejt kultúrákkal végzett kísérleteiben, ahol a BPA a fejlettségi szinttől függően gyakorolt hatást az ER α expresszióra. A vizsgálatok során a BPA expozíció szignifikánsan csökkentette az ER α receptor expressziót a 7. és 21. posztnatális napon kinyert mintákban, míg a születést követő 11. napon nyert mintában növelte a képződött mRNS mennyiségét. Ez utóbbi azt jelenti, hogy az eredményeinkben BPA alkalmazása során állatfajonként kapott eltérő értékek a patkányok és az egerek különböző fejlettségi szintjeiből származhatnak.

A leghangsúlyosabb fajspecifikus különbségek az ER β expresszió esetében mutathatók ki, amelyben az ED-kezelés hatásai patkányokban jelentősek voltak, egerekben azonban hiányoztak. Következésképpen az ER β receptor expresszió hasznos mutató lehet a jövőben, de csak patkány modellben alkalmazva.

Patkány idegsejt-tenyészetek esetén a megfigyelt ER β mRNS expressziós szintek erőteljesen emelkedett értékeket mutattak ZEA esetében, míg egér mintákban nem találtunk bizonyítékot arra, hogy a zearalenonnak lenne hatása a receptor kifejeződésre. Adibnia és mtsai. (2016) hím patkányokon végeztek kísérleteket és kutatásuk során azt vizsgálták, hogy a ZEA expozíció milyen hatással van a hereszövet és a sperma ER β receptor expressziójára. A hereszövetben ZEA-nak alacsony és magas dózisokban nincs hatása az ER β receptor mRNS expresszió szintjére, ugyanakkor közepes dózisokban fokozta a receptor kifejeződést. Az előbb említettek alapján elmondható, hogy a ZEA dózisfüggő módon indukálhatja az ER β receptor expressziót.

A patkány sejt kultúrákban az arzén kezelés az ER β receptor expresszió erőteljes emelkedését okozta, ugyanakkor egér neuronokban az As esetében nem találtunk bizonyítékot arra, hogy az arzénnek lenne hatása az mRNS expressziós szintekre. Az egér modellben kapott eredményeinkhez hasonlóan Davey és mtsai. (2007) arról számoltak be, hogy az arzénnek alacsony dózisokban nincs hatása az ER β receptorokra csirke embriókban, de nagyobb dózisokban az As csökkenti a transzkripciót az ERE expressziójának gátlása révén (Watson & Yager, 2007). Ezzel szemben Cimino-Reale és mtsai. (2008) egérből származó sejt kultúrán végeztek kísérleteket és a kapott eredmények azt mutatták, hogy az arzén növeli az ER β receptor expressziót a csontvelő sejtekben.

A BPA-val kezelt mintákban egyik rágsáló modellben sem figyeltünk meg változást. Ez a jelenség valószínűleg azzal magyarázható, hogy a BPA 100-szor gyengébben kötődik az ER β receptorokhoz, mint az 17 β -ösztadiol (Hiroi et al., 1999).

Hipotézisünket a jelen tanulmány eredményei több ponton is alátámasztják. Jelentős különbségeket mértünk a patkány és az egér ER α és ER β mRNS expressziós szintjei között, ráadásul ez az eltérés a kezeletlen minták között is megfigyelhető ER α receptor expresszió esetében. A vizsgált ED-k hatása a fajok között nemcsak nagyságrendjükben, hanem a hatás irányában (gátló vagy stimuláló jelleg) is eltértek a fajok között, ami alátámasztotta a fajspecifikus ED-hatás sejtek szintjén történő működését.

Az eredmények szerint az a következő lépésünk, hogy meghatározzuk, hogy mutat-e koncentrációfüggést az adott fajok érzékenysége. Az endokrin diszruptorok iránti érzékenységet erősen befolyásolja azok koncentrációja. Ezáltal kutatásunk következő lépése, hogy feltérképezzük, hogy adott állatfajok ED-k iránti érzékenysége hogyan függ ezen anyagok koncentrációjától.

Az ED-k bizonyos dózisokban az emberi vagy állati szervezetbe jutva kémiai szerkezetüknek köszönhetően az ER α és ER β receptorokhoz kötődnek és ezen receptorokon agonista vagy antagonist hatást válthatnak ki. Az ER-k konzervatív receptorok, például az ER α esetében a ligandumkötő egység kifejezett hasonlóságot mutat a fajok között (White et al., 1987; Gonzalez et al., 2019) – azonban az ER-okat hordozó sejtek megoszlása különbözhet a rágsálófajok között. Például a kisspeptin pozitív sejtek megoszlása a hipotalamuszon belül eltérő a két faj között: egér hipotalamuszában ezen sejtek nagy mennyiségben megtalálhatóak a periventrikuláris magban (a hipotalamuszban található terület, amely kulcsfontosságú szerepet játszik az agyalapi mirigyből származó hormonok felszabadulásában), ellenben patkányban a kisspeptin pozitív sejtek mennyisége ezen területen sokkal kevesebb (Ellenbroek & Youn, 2016). Továbbá a fiziológiás enzimek vagy receptorok és a specifikus enzim izoformák mennyisége is különbözhet fajok között, de az állatok általános metabolikus aktivitása vagy a fejlődés üteme egerek és patkányok között is változhat (Jocsak et al., 2019).

Az állatkísérletek tervezése során figyelembe kell venni az úgynevezett „3R-szabály”-t, amely az alábbiakból tevődik össze: Replacement (helyettesítés): az állatkísérlet helyett élő állatok felhasználását nem igénylő, tudományosan elfogadott módszert vagy vizsgálatot kell alkalmazni; Reduction (csökkentés): a lehető legnagyobb mértékben csökkenteni kell a kísérletek során felhasznált állatok számát; Refinement (finomítás): olyan módszerek alkalmazása, amellyel a kísérlet, a tenyésztés, a gondozás során az állatnak minél kevesebb szenvedést és fájdalmat okoznak (Graham & Prescott, 2015).

Jelen tanulmány iránymutatást ad arra vonatkozólag, hogy adott ED-ok hatását mely fajon érdemes vizsgálni, ezáltal kutatási eredményeink hozzájárultak ahhoz, hogy csökkenteni tudjuk a kísérletek során felhasznált állatok számát. Következésképpen, ha tudjuk, hogy egy adott faj nem érzékeny valamely endokrin diszruptorokkal szemben (például az egér ER α receptorai az As és a ZEA hatásaira), akkor nem mérjük rajta ezen ED-k hatását, hiszen a kísérlet eredménytelen lenne és feleslegesen áldoznánk fel az állatokat a kutatás során. Ezzel szemben, ha tudjuk, hogy egy faj érzékeny adott ED-okra (például a patkány ER α receptorai az As és ZEA hatásaira), akkor érdemes méréseket végezni rajta, a kísérletünk eredményes lesz és nem áldozunk fel szükségtelenül állatokat a vizsgálatok során.

A helyettesítéshez (Replacement) azonban hozzá kell tenni, hogy vannak olyan kísérletek, ahol mindenképpen szükséges élő állaton is kísérletezni, például abban az esetben, ha egy adott anyag vemhes állatokra gyakorolt teratogén hatását szeretnénk kizárni. A híres thalidomid hatóanyagot nem vényköteles nyugtatószerként és a terhes nők reggeli rosszullete ellen ható gyógyszerként alkalmazták az 1950-es és 1960-as évek elején. A rágcsálókön végzett előzetes toxikológiai vizsgálatok eredményei azt mutatták, hogy a rágcsálók a thalidomidot jól tolerálták és még nagy dózisokban adagolva sem volt teratogén, ami arra a következtetésre vezetett, hogy ez a hatóanyag nem toxikus és biztonságos (Barsch & Otte, 2010). Viszont az 1960-as években nyilvánvalóvá vált, hogy a thalidomid alkalmazása több ezer gyermeknél súlyos születési rendellenességeket eredményezett (Kim & Scialli, 2011). Később kiderült, hogy a thalidomid erős teratogén hatással rendelkezik emberben, főemlősökben és nyulakban (érzékeny fajok), viszont rágcsálókban például patkányokban és egerekben nem rendelkezik ilyen hatással (rezisztens fajok) (Lee et al., 2011). Ezáltal a thalidomid katasztrófa először hívta fel a figyelmet arra, hogy faji különbségek vannak a gyógyszerekre adott reakciókban/válaszokban.

Azonban a faji különbségek nemcsak a gyógyszerek iránti érzékenységben figyelhetőek meg, a bizonyos környezeti változásokra válaszul adott mRNS expressziós szintek a fajok között is jelentősen eltérhetnek. Ezt különbséget láthatjuk a koleszterin és a telített zsírsav bioszintézisében részt vevő gének szabályozásának mechanizmusában is. A koleszterin és a telítetlen zsírsav bioszintézisében részt vevő specifikus géneket a májsejtekben lévő speciális inhibitorok szabályozzák. Ezen gátlási mechanizmus nagyobb mértékű volt patkányokban, mint egerekben (Rondini et al., 2016). Mindazonáltal némely esetekben ellentétes hatások is megfigyelhetőek: az angiotenzin II hatása gátolja az STC-1 gén expressziót hím C57Bl/6 egerekben, ellenben hím Wistar patkányokban stimulálja ezen gén kifejeződését (Law et al., 2012). Ugyanakkor nemcsak az általunk vizsgált ED-k hatásaiban tapasztalhatóak eltérések a

fajok között. A DDT (diklór-difenil-triklóretán) erős ösztrogénszerű hatással rendelkezik, a szervezetbe jutva megváltoztatja a génexpressziót. Azonban a DDT kezelés hatására patkányokban és egerekben 51 specifikus gén mutatott fajspecifikus expressziót (Kwekel et al., 2013). Az emberek és az állatok között is lényeges faji különbségek figyelhetők meg. Az emberek és a rágcsálók központi idegrendszerében található neurotróf faktor gének szabályozásának specifikus mechanizmusai lényegesen eltérnek egymástól (Aid et al., 2007).

Az előbb említett példák miatt fontos a kísérlet körültekintő megtervezése, a megfelelő kísérleti modell megválasztása, annak érdekében, hogy minél kevesebb állatnak okozzunk szenvedést, illetve fájdalmat, továbbá minél eredményesebb legyen a kísérletünk, máskülönben feleslegesen áldoznánk fel kísérleti állatokat a tudomány oltárán. A vizsgálataink során bebizonyosodott, hogy még a rágcsálófajok között is szignifikáns különbségeket figyelhetünk meg az ED-k által kiváltott ER α és ER β receptor expressziós szintekben, így még inkább fontossá vált a kísérleti modell következetes megválasztása (az adott faj érzékenységének figyelembevételével) a kísérlet eredményessége és a „3R-szabály” betartása érdekében. Mindemellett a fajok közti ED-okra adott válaszok közötti különbségek lehetősége erős befolyásoló tényező lehet az ED-tesztelési protokollokban. Kísérleteinkben figyelembe véve a fajspecifikus válaszokat, csökkenthetjük az ED-kezelések téves azonosításának kockázatát, így pontosabb adatokat nyújthatunk az ED-k jövőbeli teszteléséhez és azonosításához, továbbá a megfelelő kísérleti modell megválasztásához.

8. Összefoglaló

Az endokrin diszruptorok (ED-k) olyan környezeti szennyező anyagok, amelyek egy bizonyos dózisban az állati vagy emberi szervezetbe kerülve megzavarják egyes endogén hormonok, például az ösztrogének fiziológiai szabályozási útjait. Kémiai szerkezetüknek köszönhetően képesek kötődni az ösztrogén receptorokhoz, így az endokrin rendszert alkotó receptorok agonistájaként vagy antagonistájaként hatást gyakorolnak a hormonális működésre. Jelen tanulmányban az arzén, a biszfenol-A (BPA) és a zearalenon (ZEA), mint endokrin diszruptorok alfa- ($ER\alpha$) és béta ($ER\beta$) ösztrogén receptorok mRNS expresszióra kifejtett hatását vizsgáltuk patkány és egér modellen. Az arzén a földkéregben, talaj- és ivóvízben előforduló vegyület. A BPA a műanyaggyártás során keletkező melléktermék. A ZEA különböző gabonák penészgomba-fertőzése során termelődő mikotoxin. Ezen anyagok erős hormon- és szaporítórendszert károsító hatással rendelkeznek.

A vizsgálatok folyamán feltételeztük azt, hogy az ismert endokrin diszruptorok hatása nemcsak nagyságrendben térhet el a két vizsgált állatmodellben, hanem ezek a szerek által az $ER\alpha$ és $ER\beta$ receptorokra kifejtett gátló- illetve stimuláló hatás a két állatfajban eltérő lehet. Kutatásunk során Sprague-Dawley törzsbe tartozó patkányokból és C56BL/6 egerekből származó kisagyi szemcsesejt kultúrákat állítottunk elő, kezeltük a korábban említett ED-kal, majd qRT-PCR vizsgálatot végeztünk az $ER\alpha$ és $ER\beta$ mRNS expresszió szintjének meghatározására.

Az ED-kezelések jelentős különbségeket okoztak a patkány- és az egérminták között; ez a jelenség azonban a kezeletlen „ntC” mintákban is megfigyelhető. Az egér $ER\alpha$ receptor mRNS szintje szignifikánsan magasabb volt, mint a megfelelő patkánymintákban, míg az $ER\beta$ mRNS szintek közel azonosak voltak mindkét fajban. Az ED-k által indukált változások erőteljesebbek voltak patkány mintákban, mint az egérében; továbbá figyelemre méltó különbség figyelhető meg a kezelések között a patkányok összes mintájában, kivéve a BPA-s kezelést. Ez utóbbinak csak az $ER\alpha$ expresszióra volt gyenge hatása.

Kísérleteink során részben (a BPA kivételével) megállapítást nyert a feltételezésünk, miszerint a fajok közötti ED-hatások nemcsak nagyságrendjükben, hanem a hatásuk irányában is eltérhetnek egymástól. A fajok közötti különbségek a fajspecifikus hatásmechanizmusból, veleszületett enzimekből vagy receptorokból, az állatok általános metabolikus aktivitásából vagy az eltérő fejlődési üteméből is származhat. Mivel már rágcsálófajok között is jelentős különbségeket figyelhettünk meg, így fontos az állatmodellek körültekintő megválasztása („3R-szabály”).

9. Summary

Endocrine disruptors (EDs) are environmental pollutants, that, in case of exposure, disrupt the physiological regulation of specific endogenous hormones, such as estrogens, in animals or in the human body. EDs may have a molecular structure similar to estrogens, thus the substances can bind to estrogen receptors, evoking agonistic or antagonistic hormone effects. In the present study, we've tested the effects of arsenic, bisphenol-A (BPA) and zearalenone (ZEA) as endocrine disruptors on estrogen receptor alpha ($ER\alpha$) and beta ($ER\beta$) mRNA expression in a rat and mouse model. Arsenic can be found in the earth's crust, it can contaminate the groundwater and drinking water. BPA is a by-product of plastics production. ZEA is a mycotoxin produced by molds, usually found in contaminated grain products. These substances have a strong influencing effect on the hormonal and reproductive system.

In the present experiments, we hypothesized that the differences in ED effects between species will be observed not only in magnitude, but the inhibitory or stimulatory nature of the effects on hormone receptor expression may be different between species. In our study we used Sprague-Dawley rat-derived and C56BL/6 mice-derived cerebellar granule cell cultures and we treated them with the previously mentioned EDs. After incubation, we used qRT-PCR to determine the levels of $ER\alpha$ and $ER\beta$ mRNA expression.

A clear difference between rat and mouse samples can be seen after the treatments; however, this phenomenon can be observed in the untreated “ntC” samples as well. Specific receptor mRNA levels of mouse $ER\alpha$ is significantly higher than in the corresponding rat samples, while $ER\beta$ mRNA levels were nearly equal in both species. Induced changes were more potent in rats than in mice; furthermore, a notable difference between treatments could be observed in all of the samples from rats except after the “BPA only” treatment. The latter had a detectable but weak effect only on $ER\alpha$ receptor expression.

In our experiments, our hypothesis was proved partially. Interspecific ED effects may differ not only in magnitude, but also in the agonistic/antagonistic nature of their effects. Differences between the two species may also be caused by species-specific mechanisms of action, variations in innate enzymes or receptors or in the general metabolic activity of the animals, or in different rates of development. As significant differences have already been observed between rodent species, thus, it is important to choose animal models carefully before planning an experiment (“3Rs rule”).

10. Irodalom

- Abbasian, N., Momtaz, S., Baeri, M., Navaei-Nigjeh, M., Hosseini, R., & Abdollahi, M., 2018: Molecular and biochemical evidence on the role of zearalenone in rat polycystic ovary. *Toxicol*, 154. 7–14.
- Adibnia, E., Razi, M., & Malekinejad, H., 2016: Zearalenone and 17 β -estradiol induced damages in male rats reproduction potential; evidence for ER α and ER β receptors expression and steroidogenesis. *Toxicol*, 120. 133-146.
- Aid, T., Kazantseva, A., Piirsoo, M., Palm, K., & Timmusk, T., 2007: Mouse and rat BDNF gene structure and expression revisited. *Journal of Neuroscience Research*, 85(3). 525–535.
- Anguiano, T., Sahu, A., Qian, B., Tang, W.-Y., Ambrosio, F., & Barchowsky, A., 2020: Arsenic Directs Stem Cell Fate by Imparting Notch Signaling into the Extracellular Matrix Niche. *Toxicological Sciences*, 177(2). 494-505.
- Barsch, M., & Otte, A., 2010: The legal standards for the radioactive or non radioactive drugs research and approval in the European Community and in Germany after the thalidomide catastrophe. *Hellenic Journal of Nuclear Medicine*, 13(1). 45-51.
- Belcher, S. M., 1999: Regulated expression of estrogen receptor α and β mRNA in granule cells during development of the rat cerebellum. *Developmental Brain Research*, 115(1). 57–69.
- Beyer, C., 1999: Estrogen and the developing mammalian brain. *Anatomy and Embryology*, 199(5). 379-390.
- Bryden, W. L., 2012: Mycotoxin contamination of the feed supply chain: Implications for animal productivity and feed security. *Animal Feed Science and Technology*, 173(1–2). 134–158.
- Camacho-Arroyo, I., González-Arenas, A., González-Agüero, G., Guerra-Araiza, C., & González-Morán, G., 2003: Changes in the content of progesterone receptor isoforms and estrogen receptor alpha in the chick brain during embryonic development. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 136(2). 447–452.
- Cao, H., Zhi, Y., Xu, H., Fang, H., & Jia, X., 2019: Zearalenone causes embryotoxicity and induces oxidative stress and apoptosis in differentiated human embryonic stem cells. *Toxicology in Vitro*, 54. 243–250.
- Casals-Casas, C., & Desvergne, B., 2011: Endocrine disruptors: From endocrine to metabolic disruption. *Annual Review of Physiology*, 73. 135–162.
- Castelo, M. M., Sumner, S. S., & Bullerman, L. B., 1998: Stability of fumonisins in thermally processed corn products. *Journal of Food Protection*, 61(8). 1030–1033.
- Cimino-Reale, G., Ferrario, D., Casati, B., Brustio, R., Diodovich, C., Collotta, A., Vahter, M., & Gribaldo, L., 2008: Combined in utero and juvenile exposure of mice to arsenate and atrazine in drinking water modulates gene expression and clonogenicity of myeloid progenitors. *Toxicology Letters*, 180(1). 59–66.
- Davey, J. C., Bodwell, J. E., Gosse, J. A., & Hamilton, J. W., 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.

- Deroo, B. J., & Korach, K. S., 2006: Estrogen receptors and human disease. *Journal of Clinical Investigation*, 116(3). 561–570.
- Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J. P., Giudice, L. C., Hauser, R., Prins, G. S., Soto, A. M., Zoeller, R. T., & Gore, A. C., 2009: Endocrine-disrupting chemicals: An Endocrine Society scientific statement. *Endocrine Reviews*, 30(4). 293-342.
- Dong, M., Tulayakul, P., Li, J.-Y., Dong, K.-S., Manabe, N., & Kumagai, S., 2010: Metabolic Conversion of Zearalenone to α -Zearalenol by Goat Tissues. *Journal of Veterinary Medical Science*, 72(3). 307–312.
- Ehrlich, S., Calafat, A. M., Humblet, O., Smith, T., & Hauser, R., 2014: Handling of thermal receipts as a source of exposure to bisphenol a. *Journal of the American Medical Association*, 311(8). 859-860.
- Ellenbroek, B., & Youn, J., 2016: Rodent models in neuroscience research: Is it a rat race? *Disease Models and Mechanisms*, 9(10). 1079–1087.
- Fleisch, A. F., Sheffield, P. E., Chinn, C., Edelstein, B. L., & Landrigan, P. J., 2010: Bisphenol A and related compounds in dental materials. *Pediatrics*, 126(4). 760-768.
- Gonzalez, T. L., Rae, J. M., Colacino, J. A., & Richardson, R. J., 2019: Homology models of mouse and rat estrogen receptor- α ligand-binding domain created by in silico mutagenesis of a human template: Molecular docking with 17 β -estradiol, diethylstilbestrol, and paraben analogs. *Computational Toxicology*, 10. 1–16.
- Gore, A. C., Krishnan, K., & Reilly, M. P., 2019: Endocrine-disrupting chemicals: Effects on neuroendocrine systems and the neurobiology of social behavior. *Hormones and Behavior*, 111. 7-22.
- Graham, M. L., & Prescott, M. J., 2015: The multifactorial role of the 3Rs in shifting the harm-benefit analysis in animal models of disease. *European Journal of Pharmacology*, 759. 19–29.
- Heldring, N., Pike, A., Andersson, S., Matthews, J., Cheng, G., Hartman, J., Tujague, M., Ström, A., Treuter, E., Warner, M., & Gustafsson, J. Å., 2007: Estrogen receptors: How do they signal and what are their targets. *Physiological Reviews*, 87(3). 905-931.
- Hiroi, H., Tsutsumi, O., Momoeda, M., Takai, Y., Osuga, Y., & Taketani, Y., 1999: Differential interactions of bisphenol A and 17 β -estradiol with estrogen receptor α (ER α) and ER β . *Endocrine Journal*, 46(6). 773–778.
- Hsu, K. S., Goodale, B. C., Ely, K. H., Hampton, T. H., Stanton, B. A., & Enelow, R. I., 2020: Single-cell RNA-seq Analysis Reveals That Prenatal Arsenic Exposure Results in Long-term, Adverse Effects on Immune Gene Expression in Response to Influenza A Infection. *Toxicological Sciences*, 176(2). 312–328.
- Jocsak, G., Ioja, E., Kiss, D. S., Toth, I., Barany, Z., Bartha, T., Frenyo, L. V., & Zsarnovszky, A., 2019: Endocrine disruptors induced distinct expression of thyroid and estrogen receptors in rat versus mouse primary cerebellar cell cultures. *Brain Sciences*, 9(12). 359.
- Kabir, E. R., Rahman, M. S., & Rahman, I., 2015: A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 40(1). 241-258.

- Kim, J. H., & Scialli, A. R., 2011: Thalidomide: The tragedy of birth defects and the effective treatment of disease. *Toxicological Sciences*, 122(1). 1–6.
- Kiss, D. S., Ioja, E., Toth, I., Barany, Z., Jocsak, G., Bartha, T., Horvath, T. L., & Zsarnovszky, A., 2018: Comparative analysis of zearalenone effects on thyroid receptor alpha (TR α) and beta (TR β) expression in rat primary cerebellar cell cultures. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(5). 1440.
- Kowalska, K., Habrowska-Górczyńska, D. E., & Piastowska-Ciesielska, A. W., 2016: Zearalenone as an endocrine disruptor in humans. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 48. 141-149.
- Krementsov, D. N., Katchy, A., Case, L. K., Carr, F. E., Davis, B., Williams, C., & Teuscher, C., 2013: Studies in experimental autoimmune encephalomyelitis do not support developmental bisphenol a exposure as an environmental factor in increasing multiple sclerosis risk. *Toxicological Sciences*, 135(1). 91–102.
- Kriszt, R., Krifaton, C., Szoboszlay, S., Cserháti, M., Kriszt, B., Kukolya, J., Czéh, Á., Fehér-Tóth, S., Török, L., Szoke, Z., Kovács, K. J., Barna, T., & Ferenczi, S., 2012: A New Zearalenone Biodegradation Strategy Using Non-Pathogenic *Rhodococcus pyridinivorans* K408 Strain. *PLoS ONE*, 7(9).
- Kuhl, H., 2005: Pharmacology of estrogens and progestogens: Influence of different routes of administration. *Climacteric*, 8(1). 3-63.
- Kuiper-Goodman, T., Scott, P. M., & Watanabe, H., 1987: Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 7(3). 253–306.
- Kundakovic, M., Gudsnuik, K., Franks, B., Madrid, J., Miller, R. L., Perera, F. P., & Champagne, F. A., 2013: Sex-specific epigenetic disruption and behavioral changes following low-dose in utero bisphenol A exposure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(24). 9956-9961.
- Kwekel, J. C., Forgacs, A. L., Williams, K. J., & Zacharewski, T. R., 2013: O-p'-DDT-mediated uterotrophy and gene expression in immature C57BL/6 mice and Sprague-Dawley rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 273(3). 532–541.
- Law, A. Y., Wong, C. K., Turner, J., Gonzalez, A. A., Prieto, M. C., & Wagner, G. F., 2012: Vasopressin controls stanniocalcin-1 gene expression in rat and mouse kidney. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 348(1). 183–188.
- Lee, C. J. J., Goncxalves, L. L., & Wells, P. G., 2011: Resistance of CD-1 and *ogg1* DNA repair-deficient mice to thalidomide and hydrolysis product embryopathies in embryo culture. *Toxicological Sciences*, 122(1). 146–156.
- Lewars, E. G., 1984: Oxiranes and Oxirenes. *Comprehensive Heterocyclic Chemistry*, 7-7. 95-129.
- Li, J., Waters, S. B., Drobna, Z., Devesa, V., Styblo, M., & Thomas, D. J., 2005: Arsenic (+3 oxidation state) methyltransferase and the inorganic arsenic methylation phenotype. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 204(2). 164–169.

- Maffini, M. V., Rubin, B. S., Sonnenschein, C., & Soto, A. M., 2006: Endocrine disruptors and reproductive health: The case of bisphenol-A. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 254–255. 179–186.
- Maragos, C. M., 2010: Zearalenone occurrence and human exposure. *World Mycotoxin Journal*, 3(4). 369-383.
- Minervini, F., & Aquila, M. E. D., 2008: Zearalenone and reproductive function in farm animals. *International Journal of Molecular Sciences*, 9(12). 2570-2584.
- Molina-Molina, J. M., Real, M., Jimenez-Diaz, I., Belhassen, H., Hedhili, A., Torné, P., Fernández, M. F., & Olea, N., 2014: Assessment of estrogenic and anti-androgenic activities of the mycotoxin zearalenone and its metabolites using in vitro receptor-specific bioassays. *Food and Chemical Toxicology*, 74. 233–239.
- Mueller, S. O., Simon, S., Chae, K., Metzler, M., & Korach, K. S., 2004: Phytoestrogens and their human metabolites show distinct agonistic and antagonistic properties on estrogen receptor α (ER α) and ER β in human cells. *Toxicological Sciences*, 80(1). 14–25.
- 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. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 284(3). 330–338.
- Nakamura, U., & Kadokawa, H., 2015: The nonsteroidal mycoestrogen zearalenone and its five metabolites suppress LH secretion from the bovine anterior pituitary cells via the estradiol receptor GPR30 in vitro. *Theriogenology*, 84(8). 1342–1349.
- Ogawa, S., Eng, V., Taylor, J., Lubahn, D. B., Korach, K. S., & Pfaff, D. W., 1998: Roles of estrogen receptor- α gene expression in reproduction-related behaviors in female mice. *Endocrinology*, 139(12). 5070–5081.
- Pack, E., Stewart, J., Rhoads, M., Knight, J., De Vita, R., Clark-Deener, S., & Schmale, D. G., 2020: Quantification of zearalenone and α -zearalenol in swine liver and reproductive tissues using GC-MS. *Toxicon: X*, 8. 100058.
- Pang, J., Zhou, Q., Sun, X., Li, L., Zhou, B., Zeng, F., Zhao, Y., Shen, W., & Sun, Z., 2017: Effect of low-dose zearalenone exposure on reproductive capacity of male mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 333. 60–67.
- Parodi, D. A., Greenfield, M., Evans, C., Chichura, A., Alpaugh, A., Williams, J., & Martin, M. B., 2015: Alteration of mammary gland development and gene expression by in utero exposure to arsenic. *Reproductive Toxicology*, 54. 66–75.
- Pfeiffer, E., Kommer, A., Dempe, J. S., Hildebrand, A. A., & Metzler, M., 2011: Absorption and metabolism of the mycotoxin zearalenone and the growth promotor zeranol in Caco-2 cells in vitro. *Molecular Nutrition & Food Research*, 55(4). 560–567.
- Ray, S., Rastogi, R., & Kumar, A., 2002: Current status of estrogen receptors. *Progress in Drug Research*, 59. 201–232.

- Rodríguez-Barranco, M., Lacasaña, M., Aguilar-Garduño, C., Alguacil, J., Gil, F., González-Alzaga, B., & Rojas-García, A., 2013: Association of arsenic, cadmium and manganese exposure with neurodevelopment and behavioural disorders in children: A systematic review and meta-analysis. *Science of the Total Environment*, 454–455. 562–577.
- Rogowska, A., Pomastowski, P., Sagandykova, G., & Buszewski, B., 2019: Zearalenone and its metabolites: Effect on human health, metabolism and neutralisation methods. *Toxicol*, 162. 46–56.
- Romagnolo, D. F., Daniels, K. D., Grunwald, J. T., Ramos, S. A., Propper, C. R., & Selmin, O. I., 2016: Epigenetics of breast cancer: Modifying role of environmental and bioactive food compounds. *Molecular nutrition & food research*, 60(6). 1310–1329.
- Rondini, E. A., Duniec-Dmuchowski, Z., Cukovic, D., Dombkowski, A. A., & Kocarek, T. A., 2016: Differential regulation of gene expression by cholesterol biosynthesis inhibitors that reduce (pravastatin) or enhance (squalestatin 1) nonsterol isoprenoid levels in primary cultured mouse and rat hepatocytes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 358(2). 216–229.
- Rubin, B. S., 2011: Bisphenol A: An endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 127(1–2). 27–34.
- Sabir, S., Akash, M. S. H., Fiayyaz, F., Saleem, U., Mehmood, M. H., & Rehman, K., 2019: Role of cadmium and arsenic as endocrine disruptors in the metabolism of carbohydrates: Inserting the association into perspectives. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 114. 108802.
- Saito, K., & Cui, H., 2018: Emerging roles of estrogen-related receptors in the brain: Potential interactions with estrogen signaling. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(4). 1091.
- Sengupta, P., Banerjee, R., Nath, S., Das, S., & Banerjee, S., 2015: Metals and female reproductive toxicity. *Human and Experimental Toxicology*, 34(7). 679–697.
- Sherwin, B. B., 2003: Estrogen and Cognitive Functioning in Women. *Endocrine Reviews*, 24(2). 133-151.
- Shin, B. S., Hong, S. H., Bulitta, J. B., Lee, J. B., Hwang, S. W., Kim, H. J., Yang, S. Du, Yoon, H. S., Kim, D. J., Lee, B. M., & Yoo, S. D., 2009: Physiologically based pharmacokinetics of zearalenone. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A*, 72(21–22). 1395–1405.
- Simpson, E. R., 2003: Sources of estrogen and their importance. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 86(3–5). 225–230.
- Takemura, H., Shim, J. Y., Sayama, K., Tsubura, A., Zhu, B. T., & Shimoi, K., 2007: Characterization of the estrogenic activities of zearalenone and zeranol in vivo and in vitro. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 103(2). 170–177.
- Tassinari, R., Narciso, L., Tait, S., Busani, L., Martinelli, A., Di Virgilio, A., Carli, F., Deodati, A., La Rocca, C., Maranghi, F., Valeri, M., Mancini, F. R., Cianfarani, S., Germani, D., Gastaldelli, A., Barsotti, G., Ciociaro, D., Latta, V. Della, Distanti, G., Toffol, G., 2020: Juvenile toxicity rodent model to study toxicological effects of bisphenol A (BPA) at dose levels derived from Italian children biomonitoring study. *Toxicological Sciences*, 173(2). 387–401.

- Tokar, E. J., Qu, W., & Waalkes, M. P., 2011: Arsenic, stem cells, and the developmental basis of adult cancer. *Toxicological Sciences*, 120(S1). 192-203.
- Vandenberg, L. N., Chahoud, I., Heindel, J. J., Padmanabhan, V., Paumgarten, F. J. R., & Schoenfelder, G., 2010: Urinary, circulating, and tissue biomonitoring studies indicate widespread exposure to bisphenol A. *Environmental Health Perspectives*, 118(8). 1055–1070.
- Vromman, V., Maghuin-Rogister, G., Vleminckx, C., Saegerman, C., Pussemier, L., & Huyghebaert, A., 2014: Risk ranking priority of carcinogenic and/or genotoxic environmental contaminants in food in Belgium. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 31(5). 872–888.
- Vrtačnik, P., Ostanek, B., Mencej-Bedrač, S., & Marc, J., 2014: The many faces of estrogen signaling. *Biochemia Medica*, 24(3). 329–342.
- Wang, L., Andersson, S., Warner, M., & Gustafsson, J. Å., 2001: Morphological abnormalities in the brains of estrogen receptor β knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(5). 2792–2796.
- Wang, Y., Li, L., Wang, C. C., & Leung, L. K., 2013: Effect of zearanol on expression of apoptotic and cell cycle proteins in murine placentae. *Toxicology*, 314(1). 148–154.
- Wasserman, G. A., Liu, X., Parvez, F., Factor-Litvak, P., Ahsan, H., Levy, D., Kline, J., van Geen, A., Mey, J., Slavkovich, V., Siddique, A. B., Islam, T., & Graziano, J. H., 2011: Arsenic and manganese exposure and children's intellectual function. *NeuroToxicology*, 32(4). 450–457.
- Watson, W. H., & Yager, J. D., 2007: Arsenic: Extension of its endocrine disruption potential to interference with estrogen receptor-mediated signaling. *Toxicological Sciences*, 98(1). 1–4.
- White, R., Lees, J. A., Needham, M., Ham, J., & Parker, M., 1987: Structural organization and expression of the mouse estrogen receptor. *Molecular Endocrinology*, 1(10). 735–744.
- Wolstenholme, J. T., Goldsby, J. A., & Rissman, E. F., 2013: Transgenerational effects of prenatal bisphenol A on social recognition. *Hormones and Behavior*, 64(5). 833–839.
- Wong, J. K., Kennedy, P. R., & Belcher, S. M., 2001: Simplified serum- and steroid-free culture conditions for high-throughput viability analysis of primary cultures of cerebellar granule neurons. *Journal of Neuroscience Methods*, 110(1–2). 45–55.
- Wong, J. K., Le, H. H., Zsarnovszky, A., & Belcher, S. M., 2003: Estrogens and ICI182,780 (Faslodex) modulate mitosis and cell death in immature cerebellar neurons via rapid activation of p44/p42 mitogen-activated protein kinase. *Journal of Neuroscience*, 23(12). 4984–4995.
- Xu, X. Bin, He, Y., Song, C., Ke, X., Fan, S. J., Peng, W. J., Tan, R., Kawata, M., Matsuda, K. I., Pan, B. X., & Kato, N., 2014: Bisphenol a regulates the estrogen receptor alpha signaling in developing hippocampus of male rats through estrogen receptor. *Hippocampus*, 24(12). 1570–1580.
- Zhang, Y., Gao, R., Liu, M., Shi, B., Shan, A., & Cheng, B., 2015: Use of modified halloysite nanotubes in the feed reduces the toxic effects of zearalenone on sow reproduction and piglet development. *Theriogenology*, 83(5). 932–941.

Zhu, R., Zhao, Z., Wang, J., Bai, B., Wu, A., Yan, L., & Song, S., 2015: A simple sample pretreatment method for multi-mycotoxin determination in eggs by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1417. 1–7.

Zinedine, A., Soriano, J. M., Moltó, J. C., & Mañes, J., 2007: Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An oestrogenic mycotoxin. *Food and Chemical Toxicology*, 45(1). 1–18.

Zsarnovszky, A., Földvári, É. G., Rónai, Z., Bartha, T., & Frenyó, L. V., 2007: Oestrogens in the mammalian brain: From conception to adulthood - A review. *Acta Veterinaria Hungarica*, 55(3). 333–347.

Zsarnovszky, Attila, Kiss, D., Jocsak, G., Nemeth, G., Toth, I., & Horvath, T. L., 2018: Thyroid hormone- and estrogen receptor interactions with natural ligands and endocrine disruptors in the cerebellum. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 48. 23–36.

Zsarnovszky, Attila, Le, H. H., Wang, H.-S., & Belcher, S. M., 2005: Ontogeny of Rapid Estrogen-Mediated Extracellular Signal-Regulated Kinase Signaling in the Rat Cerebellar Cortex: Potent Nongenomic Agonist and Endocrine Disrupting Activity of the Xenoestrogen Bisphenol A. *Endocrinology*, 146(12). 5388–5396.

Ábrajegyzék

1. Ábra (11. oldal): Vrtačnik, P., Ostanek, B., Mencej-Bedrač, S., & Marc, J., 2014: The many faces of estrogen signaling. *Biochemia Medica*, 24(3). 329–342.
3. Ábra (14. oldal): Lewars, E. G., 1984: Oxiranes and Oxirenes. *Comprehensive Heterocyclic Chemistry*, 7–7. 95–129.
4. Ábra (17. oldal): Molina-Molina, J. M., Real, M., Jimenez-Diaz, I., Belhassen, H., Hedhili, A., Torné, P., Fernández, M. F., & Olea, N., 2014: Assessment of estrogenic and anti-androgenic activities of the mycotoxin zearalenone and its metabolites using in vitro receptor-specific bioassays. *Food and Chemical Toxicology*, 74. 233–239.

11. Köszönetnyilvánítás és egyéb nyilatkozatok

Köszönetet szeretnék mondani elsősorban a témavezetőmnek, Dr. Jócsák Gergelynek, aki időt és energiát nem sajnálva mindig a lehető leggyorsabban, és egész idő alatt türelmesen segített mind a kutatásom, mind a diplomamunkám elkészítése során.

Szeretném megköszönni az Élettani és Biokémiai Tanszék vezetőjének, Dr. Bartha Tibornak, hogy engedélyt adott a kutató munka elvégzéséhez és ehhez lehetőséget teremtett a tanszéken.

Köszönöm Dr. Bárány Zoltánnak a segítséget, illetve az iránymutatást, mellyel hozzájárult a diplomadolgozatom megvalósításához.

Külön köszönettel tartozom Kinálné Szikora Zsuzsannának és Ósz Zsófiának, akik szakértelmükkel jólelkűen segítettek elsajátítani a kísérlethez szükséges módszereket és anyagismeretet.

Köszönet illeti a Biomatematikai Tanszék munkatársait, akik készségesen segítettek elkészíteni ezen diplomadolgozathoz szükséges adatelemzéseket.

Mindezek mellett köszönettel tartozom a páromnak, családomnak és a barátaimnak, hogy támogattak és bíztattak a diplomamunkám elkészítése során.

Végezetül, hálás vagyok mindenkinek, aki valamilyen formában hozzájárult a diplomamunkám elkészítéséhez.

Konzulensi ellenjegyzés

Alulírott Dr. János Gergely Péter..... igazolom, hogy

Németh Kata..... (a hallgató neve)

Arzen, Bifid-A és Zenadon ERK és ERB transzkripcióra készített
önálló katasztrófázis összehasonlító elemzés és értékelés.....

című diplomamunkáját ismerem, azt beadásra és védésre alkalmasnak tartom.

Budapest, 2020. 10. 11......

Dr. János Gergely Péter.....

a témavezető neve és aláírása

[Aláírás]
KLBTANESZ AIÓKEMIA

tanszék

HuVetA
ELHELYEZÉSI MEGÁLLAPODÁS ÉS SZERZŐI JOGI NYILATKOZAT*

Név: NÉMETH KATA.....
Elérhetőség (e-mail cím): NEMETH.KATA@GMAIL.COM.....
A feltöltendő mű címe: ARBÉNY, ÖSSZEFOGLALÓ ÉS REAGALÉNYOK ERK. ÉS ERD. TÁRSADALMISÁGI
KIFEJTÉSI ÖNÁLLÓ HATÁSAINAK ÖSSZEHASONLÍTÁSA EGÉR ÉS PATKÁNY MODELLLEN.....
A mű megjelenési adatai: DIPLOMAMUNKÁ, 2020.....
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 másolásvédtett PDF formára konvertálja és szolgáltatassa 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 címeire) 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, 2020. év ...11.....hó ...19...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.*