

# DIPLOMAMUNKA

Di Gennaro Plósz Kinga Anna  
2023

# Állatorvostudományi Egyetem

## **Respirábilis fém-oxid belégzés hatása egyes hormonreceptorok agybeli transzkripciójára *in vivo* egér modellben**

Effects of metal oxide inhalation on the transcription of some hormone receptors in the brain, examined in *in vivo* mouse model

Élettani és Biokémiai Tanszék  
Gyógyszertani és Méregtani Tanszék

**Készítette: Di Gennaro Plósz Kinga Anna**  
Állatorvosi szak VI. évfolyam

**Témavezető: Dr. Kiss Dávid Sándor**  
egyetemi docens  
ÁTE Élettani és Biokémiai  
Tanszék

**Dr. Kővágó Csaba**  
tudományos munkatárs  
ÁTE Gyógyszertani és  
Méregtani Tanszék

# Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke: .....	2
1. <b>BEVEZETÉS</b> .....	3
2. <b>IRODALMI ÁTTEKINTÉS</b> .....	4
2.1. A vizsgált respirábilis fém-oxidokat tartalmazó gázok .....	4
2.2. Az MMA technológia bemutatása .....	4
2.3. Kiemelt fém-oxid részecskék élettani hatásai .....	5
2.4. A kutatást felvető problémakör .....	6
2.5. A kutatásban vizsgált agyrégiók jelentősége .....	8
2.6. Vizsgált hormonreceptorok expressziója a központi idegrendszerben .....	9
3. <b>CÉLKITŰZÉSEINK</b> .....	11
4. <b>ANYAG ÉS MÓDSZER</b> .....	12
4.1. Hegesztési füst előállítása és modellállatok kezelése .....	12
4.2. Kísérleti állatok .....	12
4.3. Mintavétel .....	13
4.4. Minta előkészítése .....	13
4.5. Kvantitatív Polimeráz láncreakció .....	15
4.6. Statisztikai elemzés .....	17
5. <b>EREDMÉNYEK</b> .....	18
5.1. Ösztrogén receptorok mRNS mennyiségének változása.....	18
5.2. Pajzsmirigyhormon receptorok mRNS mennyiségének változása .....	19
5.3. PPAR- $\gamma$ mRNS mennyiségének változása .....	21
5.4. Az eredmények összesítése agyrégiók szerint .....	22
6. <b>MEGBESZÉLÉS</b> .....	25
6.1. Az ösztrogén receptorok mennyiségi változásaiból vélhető következmények.....	26
6.2. A pajzsmirigy receptorok változásából adódó lehetséges élettani hatások .....	28
6.3. A PPAR- $\gamma$ receptorok változásából eredő élettani hatások.....	29
6.4. A receptor-regulációs hatások időbeli- és agyrégiók szerinti eltérései.....	30
7. <b>ÖSSZEFOGLALÁS</b> .....	32
8. <b>SUMMARY</b> .....	33
9. <b>IRODALOMJEGYZÉK:</b> .....	34
10. <b>KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS</b> .....	37

## Rövidítések jegyzéke:

AD	Alzheimer-kór
ALS	Amiotrófiás laterálszklerózis
C	Cortex (agykéreg)
CE	Cerebellum (kisagy)
Ct	Áttörési ciklus
ddCt	Delta-Delta-Ct (relatív expressziós ráta)
ER	Ösztrogén receptor
HC	Hippocampus
HT	Hypothalamus
KIR	Központi idegrendszer
LBD	Lewy-testes demencia
MAK	Maximális munkahelyi koncentráció
MMA	Manual Metal Arc (bevontelektrodás kézi ívhegesztés)
OB	Bulbus olfactorius (szaglőhagyma)
OSHA	Occupational Safety and Health Administration
PD	Parkinson-kór
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor (peroxiszóma proliferátor által aktivált receptor)
ROS	Reactive oxygen species (reaktív oxigén gyök)
Str	Structural steel (szerkezeti acél)
T	Thalamus
TNF- $\alpha$	Tumor nekrosis faktor alfa
TR	Pajzsmirigy hormon receptor
WHO	World Health Organization

# 1. BEVEZETÉS

A respirábilis fém-oxid nanorészecskék a levegőben diszpergáltan előforduló olyan vegyi anyagok, amelyek különféle fémmegmunkálás során, vagy kémiai reakciókból felszabadulva lebegés útján tudnak az élőlények szervezetébe jutni. Ezen részecskék előállítására kutatásunk során hegesztési eljárással létrehozott füstöt használtunk fel, amely nagy mennyiségben tartalmazza ezen fém-oxid részecskéket.

A hegesztés manapság a világ minden pontján elterjedt fontos ipari tevékenységkör, amely szektorban milliók dolgoznak. A hegesztés során különböző technológiák segítségével oldhatatlan kötést hoznak létre fém alkatrészek között azok olvadáspontra hevítésével. A folyamat során füst képződik, amelyben a fém-oxid nanorészecskék diszpergáltan találhatók, melyek megfelelő elszívó berendezés hiányában könnyedén belélegezhetőek. Fontos kiemelni, hogy nem csak ezen technológia alkalmazásával szabadulnak fel ilyen molekulák, hanem az ipar számos más területén is jelen vannak. Kutatásunkban a bevont elektródás kézi ívhegesztés (Manual Metal Arc; MMA) technika során keletkező füstök hatásait elemeztük.

A füstből a tüdőbe bekerülő fém-oxidok a szervezetben felhalmozódva, számos elváltozáshoz vezethetnek. Ezen vegyületek a központi idegrendszerbe kerülve állhatnak neurodegenerációs kórképek hátterében, illetve sejtszintű elváltozások keletkezhetnek a jelenlétükben. Kiválthatnak oxidatív stresszt is, amely kapcsán neuroinflammációs kórképek is felléphetnek, amennyiben állandó expozíciónak van kitéve az adott szervezet.

A kutatásunk középpontjában azokat a központi idegrendszer (KIR)-ben kialakuló, neuro-endokrin elváltozásokat vizsgáltuk, amelyeket a fém-oxid expozíció érinthet az adott munkakörülmények között felszabaduló füstök jelenlétében. Összefüggéseket próbáltunk keresni a KIR-be kerülő részecskék és bizonyos neurodegeneratív kórképek között.

## 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 2.1. A vizsgált respirábilis fém-oxidokat tartalmazó gázok

A World Health Organization (WHO) felmérései alapján bizonyos, hogy a hegesztőfüstök belélegzése karcinogén, ez daganatképződéshez vezethet a légzőapparátus számos helyén [1]. Az Occupational Safety and Health Administration (OSHA) 2004-ben benyújtott egy kérvényt, mi szerint maximalizálják a munkaórák számát 8 órában heti 40 óra maximummal, annak érdekében, hogy csökkentsék a munkavállalók kitettségét. Ez a bizonyos kérvény a króm VI-t okolja az idővel megjelenő tüdőrák, asztma, illetve számos légúti irritációs kórkép kialakulásáért [2]. A megengedett hegesztési munkaórákat betartva, a hegesztési füst koncentrációja nem haladhatja meg a  $8 \text{ mg/m}^3$ -t a munkaterület levegőjében, de ezen koncentráción belül még figyelniük kell az egyes összetevőkre is, melyek a maximális munkahelyi koncentráció (MAK) értékeknek kell megfeleljenek. A fő figyelmet a króm, mangán és vanádium értékeire kell helyezni, melyek maximálisan  $2\text{-}3,8 \text{ mg/m}^3$  koncentrációt érhetnek el, bár tüdőkárosító hatásuk így is számottevő. Ha a részecske-koncentráció eléri a  $9 \text{ mg/m}^3$ -t, szellőztetni kell a helyiséget természetes vagy mesterséges módon, akár szűrőkkel ellátott elszívók segítségével [3].

Ezekből a szabályozásokból is láthatjuk, mekkora jelentősége van a már említett ipari elszívók, illetve az aktívan szellőztetett hegesztőpajzsok használatának, melyek manapság elérhető eszközei a munkavállalók védelmének a levegőben jelenlevő nanorészecskékkel szemben.

A füstben lévő részecskék méretükből adódóan könnyedén eljutnak a tüdő legkisebb egységeibe, az alveólusokba is. Egyes kutatások bizonyították, hogy képesek apró vérzéseket (hemoptysis-t) okozni ott [4]. Az alveólusok elzáródása, illetve sérülése, a test és a tüdő szöveteinek oxigenizáltságának csökkenését vonhatja maga után, amely az elégtelen oxigén szaturációval monitorozható.

### 2.2. Az MMA technológia bemutatása

A bevont elektródás kézi ívhegesztés (MMA) egy olyan hegesztési technika mely során szinte minden típusú acél között oldhatatlan kohéziós kötést lehet létrehozni, illetve lehetőséget ad fémek pl. nikkal, réz és akár öntöttvas hegesztésére is. Az ív hőmérséklete ennél a technológiánál  $2400$  és  $5000 \text{ }^\circ\text{C}$  közé esik [5].

A hegesztőelektróda olyan bevonattal rendelkezik, melynek egy része a hegesztés folyamata során a varratra ráakódik, emellett bizonyos komponensek elégetésével védőgázt fejleszt, így védelmet nyújt a fémolvadék oxidációja ellen. Ezek a bevonatok elektródától függően különböző anyagokból készülnek, gyűjtőnevükön salak- és gázképzőként ismertek. Ezt a képződő salakot a varrat elkészültével külső fizikai behatással el kell távolítani, hogy a végleges varrat a felszínre kerüljön.

Az elektróda varratképző anyagát tekintve lehet acél, öntöttvas, réz, nikkel, alumínium. A bevonatot alkotó anyagok között a következők szerepelnek:  $\text{CaCO}_3$ ,  $\text{CaF}_2$ ,  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{SiO}_2$ , illetve szilikátok, vasérc, szerves anyagok (pl. cellulóz), ötvöző és dezoxidáló anyagok (pl. Mn, Si) valamint egyes gázképző anyagok is. A varratok felett képződő salak összetételét tekintve főleg különféle oxidokról beszélhetünk. Az említett oxidok lehetnek bázikusak (pl.  $\text{CaO}$ ,  $\text{MgO}$ ,  $\text{MnO}$ ,  $\text{FeO}$ ,  $\text{CrO}$ ), savasak (pl.  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{P}_2\text{O}_5$ ) és semlegesek is (pl.  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ,  $\text{Cr}_2\text{O}_3$ ). Az elektródák tulajdonságait nemzetközi jelölés rendszerrel látják el, így a legmegfelelőbb elektródát bizonyos acélok megmunkálásához könnyen ki lehet választani [3].

A füst alkotóelemeinek tekintetében a hegesztés folyamata során nem csak a hegesztő elektróda összetételével, hanem a megmunkálandó anyag összetételével is számolnunk kell. Ezzel a technológiával ugyanis számos fémmegmunkálás kivitelezhető pl. ötvözetlen vagy finomszemcsés acélok, korrózió és hőálló acélok, vasöntvények és Al, Cu, Ni, Ti és Mg ötvözeteinek hegesztése is. Ezekben a szerkezeti elemekben a különféle fémek eltérő arányokban való jelenléte adja az anyag minőségét [3].

### **2.3. Kiemelt fém-oxid részecskék élettani hatásai**

A fent említett technológia alkalmazása során a következő respirábilis fémek oxidjai fordulhatnak elő.

- Mangán (Mn): krónikus expozíció mellett szerepet játszik a Parkinson-kór (PD) és az Alzheimer-kór (AD) kialakulásában. Ezen felül mitokondriális funkciózavarokat okozhat a mikrogliaokban, továbbá serkenti a gyulladásos mediátorok felszabadulását, amely neurotoxikózist eredményez [6]. Az agyban felhalmozódva (főleg a bazális ganglionban) úgynevezett mangánizmust eredményez, amely szintén a PD-hez hasonló kimenetelű kórkép [7].
- Réz (Cu): túlzott kitettség hatására elsősorban a májban rakódik le, amennyiben a vérárammal szállítódik. A máj cirrhotikus lesz, továbbá vérzések is

kialakulhatnak. Hemolízis kialakulása miatt az agy, a vese és számos más szerv is károsodhat. Sejtszinten is toxikus, jelenléte reaktív oxigéngyökök (Reactive Oxygen Species; ROS) felszabadulásához vezet, továbbá a DNS-ben is károsodást eredményezhet. Kimutatták, hogy szintén szerepet játszik a PD, AD és az amiotrófiás laterálszklerózis (ALS) kialakulásának elősegítésében, mivel megemelkedik a  $\beta$ -amiloid fehérjék lerakódása [8].

- Nikkel (Ni): szubakut toxikózis esetén a légzőszervrendszert irritálhatja, illetve az emésztőszervrendszerben alakulhatnak ki mérgezéses tünetek. Túlzott kitettségénél agyi ödéma alakul ki, ami akár halálhoz is vezethet. Vegyületei karcinogén tulajdonságot is mutatnak [9].
- Króm (Cr): ennek a fémnek különböző oxidációs állapotú ionjai más-más toxicitási mutatóval rendelkeznek. Az ipari szennyeződések főleg Cr (VI)-t tartalmaznak, amely erősen karcinogén. Főleg tüdő-, agy-, vese-, csontdaganatokat képez, sok más szervben fellépő daganatos elváltozás mellett. A DNS molekulákat képes instabilizálni ROS felszabadulásával, ezáltal sejtszintű károsodást is okoz [10].
- Alumínium (Al): az idő előrehaladtával az Al az agyban felhalmozódik és neurotoxicitás révén számos komoly kórképet eredményez, mint pl. AD, PD, agyvelőgyulladás, cerebrális amiloid angiopátia [11]. Ezen felül a mellrák kialakulásában is fontos szerepet játszik.
- Vas (Fe): belélegzés útján oxidjai tüdőfibrózishoz, tüdőrákhoz és sziderózishoz vezethetnek [12]. A Cu és Zn mellett az Fe is hozzájárul a  $\beta$ -amiloid fehérjék lerakódásához, ezzel elősegítve az AD kialakulását [8].

## **2.4. A kutatást felvető problémakör**

Napjainkban a nehézipar fémekkel foglalkozó munkaterületein a fejlett munkavédelmi előírások kikötik, hogy speciális elszívókkal biztosítani kell a munkavállaló részecskékkel szennyezett levegővel szembeni alacsony kitettségét. Nagyon sokan foglalkoznak hegesztéssel kisipari szinten vagy hobbi formájában is, nem beszélve a fejlődő országokról, ahol nagyüzemi szinten sem biztosított legtöbbször megfelelő berendezés a szennyezés eltávolítására.

A keletkező füstben fém-nanorészecskék vannak [13], amelyek belélegezve képesek a KIR-be jutni és számos elváltozást okozni. Az elszívók jelentősen csökkenthetik a



levegőben a nanorészecskék koncentrációját, azonban még így is számottevő az a mennyiség, amely a szervezetbe kerülhet. A fém-oxidok a szervezetbe bejutva különféle szerveket fognak károsítani, a toxicitás bár sok esetben dózisfüggő, a hosszútávú hatások minden esetben pathológiásak.

A belélegzés útján bejutó fém-oxid nanorészecskék nem csak a KIR-ben okozhatnak elváltozásokat, hanem légzőszervi problémákat is vonhatnak maguk után, mint például: bronchusok gyulladása, tüdőkapacitás romlása, gyulladással járó betegségek fokozott megjelenése, illetve a tüdődagasztások kialakulásában is részt vehetnek [14].

A fém-oxidok szájon át való bejutása főleg a gasztrointesztinális traktust fogja érinteni. Ezen hatások a legenyhébbtől, mint pl. hasmenés, remegés, akár a teratogén hatásig is kiterjedhetnek. A tartós expozíció hatására bizonyos átmeneti és színesfémek alacsony dózisa is veseelégtelenséghez vezethet, azonban magas dózisban főleg a tüdőt fogja érinteni [15].

A hegesztőfüstben nagy mennyiségű fém-oxid részecske fordul elő, amelyek közül, ha ki kellene emelni egyet, akkor a mangánt említve, számos szakmai publikáció összefüggést mutat a belélegzett dózis és a neurológiai tünetek kialakulása között. A mangántartalom nagyban függ az alkalmazott technológiától, illetve a hegesztendő anyagtól is [14] de magától értetődik, hogy kis mennyiségű krónikus kitettség a felhalmozódás okán jelentős károsító hatást fejthet ki.

Kutatásunkat azért irányítottuk a KIR érintettségének vizsgálatára, mert számos szakcikkből szoros összefüggést mutattak ki az AD, PD és egyéb neurodegeneratív betegségek előfordulása és a hegesztőfüstök belélegzése között [16]. A fém-oxidok belélegzése során nemcsak a PD tünetei jelentkeztek, hanem bizonyos esetekben alvási zavarok, vestibuláris vagy hallási gondok, illetve számos kognitív zavar is. A fém-oxid részecskék belélegzése kapcsán az is kezd kirajzolódni, hogy ezek a nanorészecskék oxidatív stresszt is okozhatnak, amely kiválthatja a dopamin auto-oxidációját ez által kialakulhatnak olyan gyógyíthatatlan kórképek is mint a PD vagy AD [17].

Egy friss kutatás során érdekes eredményeket mutattak ki egyes sejtstruktúrák változása, illetve a neurodegenerációs kórképek között. Ebben a kutatásban a telomerek rövidülését tanulmányozták, amely a KIR-ben neurodegenerációhoz vezethet és összefüggést találtak a hegesztő füstök belélegzése és az oxidatív stressz fokozódása között is, amely tovább erősíti a rövidülésüket. További tanulmányok bebizonyították még a Tau fehérjék kicsapódását, illetve  $\beta$ -amiloid plakk képződését, amelyek a neuronális szintapszisokban rakódnak le ezzel a PD, az AD, illetve a Lewy-testes demenciát (LBD)

segítik elő. A tünetek az érintett emberek körében hasonlóak, az idő előrehaladtával egy lassan beszűkülő tudatállapotban fognak manifesztálódni [18].

## **2.5. A kutatásban vizsgált agyrégiók jelentősége**

Az agy pontosabb vizsgálata érdekében annak adott régióit a szakirodalomra támaszkodva, illetve azok funkciói alapján választottuk ki így fókuszálva arra, hogy folyamatosan szűkíteni tudjuk a fém-oxidok bejutási útvonalát, illetve fő hatásrégióit.

A vizsgált régiók a következők voltak:

- **Bulbus olfactorius (OB):** a levegőben diszpergált részecskék a légutakon keresztül érik el az OB-t, majd onnan az idegpályákon közlekedve bejuthatnak az agyba, lévén ebben az agyrégióban tudnak az átkapcsolódások létrejönni. Ez az útvonal tűnik a legdirektebbnek, amely megkerülve a vér-agy gátat, ezeket a részecskéket eljuttathatja a KIR-be. Ezen fém-oxid részecskék stimulálják az immunválaszt, amely a helyi gyulladással mediátorokkal neuronális károsodást okozhatnak [19].
- **Hypothalamus (HT):** a fém-oxid részecskék a vérpályába bejutva, a keringéssel a vér-agy gáthoz jutnak. A HT mediobazális része a vér-agy gát egyik központi szereplője, ebben a régióban módosult szerkezet figyelhető meg, amelyen keresztül ezen részecskék könnyebben bejuthatnak a KIR egyéb területeire [20]. Ha ez az agyterület súlyosan sérül, a vér-agy gáton keresztül szabad utat kap sok egyéb toxikus anyag is, amely még inkább ronthatja a kialakuló szisztémás tüneteket. Mivel ez az agyterület a hormonális funkciók fő integrátora, így sérülése igen változatos elváltozásokat okozhat a hormonális szabályozás teljes vertikumában.
- **Cerebellum (CE):** fő funkcióját tekintve a mozgáskoordináció, motoros képességek fiziológiás funkciójáért felel. A fémek, fém-oxidok lerakódása (pl. Cd, Se részecskék) a Purkinje-sejtek pusztulását eredményezi, amely a kisagy romló teljesítőképességéhez, a mozgáskoordináció romlásához, illetve életminőséget befolyásoló egyéb tünetegyütteshez vezethet [21].
- **Thalamus (T):** köztiagyban található struktúra, amely kulcsszerepet kap az információ átkapcsolásban. Ebben az agyrégióban a fém-oxid akkumuláció (mint pl. Cu, Mn, Pb) mitokondriális zavarokat, oxidatív stresszt, vérzéseket és apoptózist is eredményezhet. Ha ezt a központot oxidatív stressz éri, biztosan szisztémás problémákat fog eredményezni [22].

- Hippocampus (HC): ezt az agyrégiót számos neurológiai elváltozás érinti, ezért is gondoltuk fontosnak munkánk során is a tanulmányozását, mivel magas érzékenységet mutat a fém-oxid ionok hatásaira. Ezen részecskék (pl. nano-MnO<sub>2</sub>) asztrocita aktivációt generálnak, amely a HC homeosztázisát befolyásolva felborítja annak normál működését. Ezt a működészavart memóriavesztés, orientáció kiesés, viselkedési zavar és tanulási nehézség jellemzi [23].
- Cortex (C): ebből a területből indul el számos ingerület továbbítás a piramis- és csillagsejteknek köszönhetően. Ez az agyrégió is magas szinten kitett a fém-oxidok hatásainak, mint pl. Mn, Zn, Cu. Az ezen a területen bekövetkező neuronok sérülése memóriazavarhoz, belassult felfogóképességhez, illetve olyan neurodegeneratív kórok kialakulásához vezethet, mint a PD, AD vagy ALS [24].

## **2.6. Vizsgált hormonreceptorok expressziója a központi idegrendszerben**

A vizsgált agyrégiókon belül, azok érintettségét az ösztrogén (ER), a pajzsmirigy hormon- (TR) és a peroxiszóma proliferátor által aktivált gamma receptor (PPAR- $\gamma$ ) mennyiségi változásán keresztül mértük. Ezen receptorcsaládok nem csak számtalan endokrin funkcióért felelnek, de mennyiségi változásuk szinte minden élettani funkciót befolyásol pl. fiziológiás protein expresszió, celluláris metabolizmus, neuroprotektív és regenerációs folyamatok. Így, ha változást eredményez bennük valamilyen külső hatás a szervezetben az szisztémás tünetekként fog manifesztálódni.

- Az ER- $\alpha$ -t és ER- $\beta$  receptorok fontosabb funkciója:

Az ösztrogén számos szaporodásbiológiai folyamatot segít elő, ilyen például a sejtek növekedése, osztódása, illetve azoknak a differenciálódása is. A fő termelődési helye a petefészkekben van. Férfiakban és posztmenopauzás nőkben citokrómok segítségével szintetizálódik tesztoszteronból és androsztendionból [25]. Mennyiségének szabályozása a hypothalamus-hypophysis-gonadal tengelyen keresztül történik.

Bebizonyították, hogy nem csak szaporodásbiológiai szerepe, hanem védelmi szerepe is van az agyban. Neurodegeneráció elleni hatás figyelhető meg mind akut, mind krónikus károsodások esetén. Megfigyelték, hogy posztmenopauzás nők esetén, ha ösztrogén terápiát folytattak, csökkent a kognitív romlás, a depresszió mértéke, illetve késleltetve jelentkezett az AD [26]. A receptorok megemelkedett szintje összefüggésben állhat az asztrociták megnövekedett glikogén

raktározásával, amely korrelálhat a megváltozott lipid, illetve glikogén metabolizmussal a szervezet más területein. Továbbá összefüggést mutattak ki az ösztrogénreceptorok és a neurodegenerációs kórképek megjelenése elleni védelemben is. Ezen tulajdonságai miatt, központi szerepet kapott a vizsgálata.

A feljebb leírt agyrégiók közül kiemelkedő az OB és HT jelentősége. Kimutatták ugyanis, hogy nagy számú ER ( $\alpha$ ,  $\beta$ ) található ezen területeken. Magas számban mértek ER- $\alpha$ -t az amygdalohippocampális régiókban és a HT-ban. Az ER- $\beta$  szám főleg az OB-ban, HT-ban volt kiemelkedő [27].

- A TR- $\alpha$  és TR- $\beta$  kiemelkedő szerepei:

A pajzsmirigy hormonok felelnek főleg a szervezet normál növekedéséért, illetve a felnőtt szervezet metabolizmusának helyes szabályozásáért. Számos tényező befolyásolja a termelését, például a dopamin, a szomatosztatin és a számunkra kiemelkedő jelentőségű leptin. Az agyban nagy jelentősége van a pajzsmirigy hormonok jelenlétének, ugyanis számos neurológiai tünet, illetve hozzá köthető betegség jelentkezett a csökkent mennyiség során, mint például az Allan-Herndon-Dudley Szindróma [28].

Bebizonyították továbbá, hogy az agy normál fejlődésének elősegítése mellett, védelmi funkciója is van, esetleges agyi traumák után elősegítheti a neuroregenerációt. A receptorok számának növekedését megfigyelték abban az esetben, ha védelmi funkciót kell ellátni a KIR-en belül, pl. gyulladás, sérülés. Továbbá ez a receptor szoros összefüggésben áll a leptin anyagforgalmával és az asztrociták működésével is [29].

- A PPAR- $\gamma$ -t szerepe:

Fő funkciójuk az energia homeosztázis fenntartásában, illetve a gyulladásos folyamatok lezárásában van. A PPAR- $\gamma$  hatalmas szerepet játszik a szabadzsírsavak felvételének elősegítésében, illetve csökkenti a már kialakult inzulin rezisztencia mértékét is. Számunkra kiemelkedő tulajdonsága a gyulladásos folyamatokban van, ugyanis gyulladás ellenes hatást mutattak ki a PPAR- $\gamma$  aktivitásának növekedésével. Befolyásolja egyes fehérvérsejtek koleszterin háztartását, illetve csökkenteni tudják a tumor nekrozis faktor alfa (TNF- $\alpha$ ), illetve más gyulladást indukáló citokinek mennyiségét [30]. Ebből arra következtethetünk, hogy ha a receptor száma jelentősen megnő, egy adott területen annak hátterében gyulladás állhat.

### 3. CÉLKITŰZÉSEINK

Az irodalmi áttekintésben bemutatott, hegesztési technológia során felszabaduló hegesztőfüstből a légkörbe kerülő fém-oxid részecskék, méretükből adódóan potenciálisan bejuthatnak a KIR-be. A fent említett okok miatt ezen nanorészecskék hozzájárulhatnak egyes KIR-ben megtalálható struktúrák károsodásához, illetve ezen belül azt feltételezzük, hogy az ER, TR és PPAR hormonreceptorok expresszióját módosíthatják és a receptorokhoz köthető mechanizmusok változhatnak. Ennek megfelelően célkitűzésünk, hogy fémoxid-nanorészecske belélegeztetést követően mérjük a receptorok génexpresszióját és figyeljük azt, hogy a transzkripciós expresszió mutat-e agyrégió specificitást, amennyiben változik. Összefüggéseket keresünk e fém-oxid kezeléstől eltelt idő és a vélhetően kiváltott receptor-génexpresszió változás között, így a kapott receptorális változások függvényében további releváns bizonyítékokat szeretnénk találni a káros hatások alátámasztására és a neurodegenerációs kórképek kialakulásának okaira.

Fel szeretnénk hívni a figyelmet olyan emberek munkahelyi egészség-védelmének javítására, akik közvetlen kitétségben dolgoznak ezen részecskékkel. Ilyen munkahelyek a fém- illetve vegyipar számos területén előfordulnak. Ezek mellett manapság a különböző szervesetlen nanorészecskék felhasználása miatt az érintettek köre folyamatosan bővül, így fontos figyelemmel lenni az egyre szélesebb körben alkalmazott technológiákból felszabaduló fém-oxid részecskéket tartalmazó füstök esetleges toxikológiai kockázataira mind állatorvosi-, humán- és ökotoxikológiai viszonylatban is.

## 4. ANYAG ÉS MÓDSZER

### 4.1. Hegesztési füst előállítás és modellállatok kezelése

A különböző hegesztési technikák során felszabaduló aeroszokok által okozott agyi működészavarok vizsgálatának témájában, a Dr. Kővágó Csaba által vezetett kutatócsoporttal 2020-ban indult munkánkon jelenleg is aktívan dolgozunk. Az NKFIH FK\_18 (száma: 129055) pályázat segítségével, egy több éves munkaterv állt a kutatás rendelkezésére.

A hegesztési füstöt Rehm Tiger 180 AC Ultra típusú hegesztőgép (REHM GmbH u. Co. KG Schweißtechnik, Ugingen, Németország) alkalmazásával, S235 minőségű szerkezeti acél (Structural steel; Str) lemezekre történő felrakó hegesztéssel állítottuk elő. A hegesztéshez 2,5 mm maghuzal átmérőjű ESAB 46.00 típusú rutil bevonatú elektródákat (ESAB Corporation, North Bethesda, Maryland, Amerikai Egyesült Államok) alkalmaztunk, 80 A áramerősséggel leolvasztva.

A keletkezett füstöt egy Kemper SmartMaster (Kemper GmbH, Vreden, Németország) típusú elszívó berendezés segítségével távolítottuk el a hegesztés helyéről. Az elszívó légvezetékébe került beiktatásra az a kezelő kamra, melyben az exponálandó kísérleti állatok kerültek elhelyezésre, kezelésként 4 db, 2 hím és 2 nőstény.

A kísérleti állatokat egy EMKA Whole Body Plethysmograph rendszer (EMKA Technologies, Párizs, Franciaország) mérőkamráiba (1. ábra) helyeztük el egyesével takarmány és ad libitum ivóvíz ellátással. Ezeket a mérőkamrákat helyeztük el a fent említett kezelőkamrába.

A kísérleteinkben 4 órás MMA füst expozíciót követően, 24 (akut), illetve 96 óra (szubakut) inkubációs időt alkalmaztunk, amely a fém-oxidok KIR-be való bejutására hagyott időintervallum. A kezelt csoportok eredményeit kezeletlen kontrol állatok eredményeihez hasonlítottuk.

### 4.2. Kísérleti állatok

A kísérlet folyamán *in vivo* állatmodelleken folytak a beavatkozások. Az állatmodellek mindkét nembe tartozó 8 hetes, BALB / C egerek voltak, amelyeket az Országos Onkológiai Intézet, (Budapest, Magyarország) biztosított. Ezek a kísérleti állatok voltak a legalkalmasabbak a kísérletben alkalmazott berendezések szempontjából, továbbá

szakpublikációkra támaszkodva döntöttünk a fajta mellett. A jelenleg érvényes állatkísérleti engedélynek a sorszáma: PE/EA/1335-8/2019.

Az állatokat standard laboratóriumi körülmények között 24-25 °C-os hőmérséklet, 55-60 % közötti páratartalom mellett, illetve zajtól és huzattól védve tartottuk. Ad libitum víz és általános egértápot kaptak 12 órás fény és 12 órás sötét megvilágítási ciklust biztosítottunk.

A kontroll csoportba tartozó egereket is azonos körülmények között tartottuk, így azonos stresszorok érhatték az állatokat, a berendezésekbe való áthelyezést is véghez vittük ezen csoportokon is, csak a füstgázos kezelés hiánya volt az eltérés a kezelési csoportokhoz képest.

### **4.3. Mintavétel**

A hegesztőfüsttel való 4 órás kezelést követően 24 vagy 96 órával, a kísérleti beosztásnak megfelelően az egércsoportokat rágcsáló guillotine használata segítségével dekapitáltuk, majd a kiserkenő vért kémcsövekbe felfogtuk a kísérlet egyéb területeire való felhasználása érdekében (zsigeri szervekben való fém-oxidok felhalmozódásának kutatásában). A fejlet borító bőrt eltávolítottuk, majd az izmokat is óvatosan visszafejtettük. Ezt követően a koponyát az öreglyuktól kiindulva a fülek mögött ívben, olló segítségével felfejtettük, ügyelve az agyszövet épségére. Óvatos mozdulatokkal kiemeljük az agyat a koponyaüregből ügyelve arra, hogy az OB, HT ne szakadjon le a mintáról. Az agy eltávolítása során fontos volt az időfaktor, ugyanis a mérni kívánt mRNS a szövetekben gyorsan elbomolhat. Az agy eltávolítást követően, agyrégiókra bontottuk a lehető legkevesebb idő alatt, majd ezeket a területeket Trizol reagensbe helyeztük.

Agyrégió specifikusan vizsgáltuk az agyba bejutott fém-oxid nanorészecskék hatásait, hormonreceptorok génexpressziójának mérésével. A vizsgált agyrégiók következők voltak: OB, HT, CE, HC, T, C, míg a receptorok: ER- $\alpha$ ,  $\beta$ , TR- $\alpha$ ,  $\beta$  és PPAR- $\gamma$ .

### **4.4. Minta előkészítése**

Mintaelőkészítés szempontjából, az RNS izolációjához Direct-zol RNS MiniPrep kit-et használtunk (Zymo Research, Irvine, USA), amelynek segítségével gyorsan és egyszerű eljárásokkal tudunk kiváló minőségű tisztított RNS-t izolálni (1. ábra). Trizolt tartalmazó Eppendorf-csőbe helyeztük a mintákat, agyrégió specifikusan és a gyártó utasításait betartva a minta mennyisége 10%-a volt a Trizol térfogatának. Ezt követően UH

homogenizátorral értük el a szövetmintáink feltárását úgy, hogy minden mintát háromszor 10 másodpercig homogenizáltunk 70% erősséggel. A kapott termékeket pedig felhasználásig -20 °C-on tároltuk.

A szövettörmelék eltávolítása érdekében 12 ezer g-n egy percig centrifugáltuk a mintát majd a felülúszót RNS-s mentes csőbe pipettáztuk. Ezt követően egy egységnyi etanolt (95-100%) egy egységnyi TRI-zolos mintához (1:1) adtunk és elegyítettük vortex segítségével. A keveréket Zymo-Spin IIC Column oszlopra rétegeztük, amelyet aztán a Zymo Spin termék használati utasításának megfelelően tisztítottunk (2. ábra). A tisztítást követően 400 µl Direct-zol RNA PreWash puffert adtunk az oszlophoz és ismét 1 percig centrifugáltuk. Eldobtuk az átfolyt folyadékot, majd megismételtük ezt a lépést. Miután ezzel kész voltunk, 700 µl RNA Wash Buffer-t adunk az oszlophoz és centrifugáltuk 1 percig majd szintén eldobtuk az átfolyt folyadékot. Annak érdekében, hogy biztosítsuk a mosó puffer teljes eltávolítását még 2 percig centrifugáltuk az oszlopot egy kiürített gyűjtőcsőben. Ezután helyeztük át az oszlopot óvatosan egy RNase mentes csőbe és adtunk hozzá 50 µl DNase/RNase mentes vizet és centrifugáltuk 1 percig. Az eluált RNS-t azonnal felhasználhatjuk vagy tárolhatjuk -70 °C-on. A minták RNS mennyiségét Nanodrop-al (Nano Drop Technologies Llc, Wilmington, USA) kvantifikáltuk.



1. ábra: EMKA Whole Body Plethysmograph



2. ábra: Mintaelőkészítésben felhasznált anyagok.  
Limbozki Richárd Dénes szakdolgozótársam készítette



Az RT-PCR során az RNS mintákat cDNS-sé írtuk át. Spektrofotométerrel megmértük a minta RNS tartalmát, így megkaptuk, hogy 1  $\mu$ l mintában hány  $\mu$ g RNS van. A kapott eredményekből meghatározhattuk, hogy 3  $\mu$ g RNS milyen mintatérfogatban található, és ezt a következő lépésben kimértük majd hozzáadtuk a master mix-hez, amely a következő anyagokat tartalmazta: 1  $\mu$ l 0,2mM oligo (dt) primer  $\mu$ l, 2  $\mu$ l dNTP, 12  $\mu$ l ribonukleáz-mentes víz, 4  $\mu$ l RT puffer, 2  $\mu$ l  $MgCl_2$  és 30  $\mu$ l Red Taq Polymerase (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) enzim. Az anyagokat felhasználásig hűtve tároltuk, kesztyűben és fülke alatt dolgoztunk. Az így kapott elegyet a PCR készülékbe helyeztük. A ciklus során a minta 70 °C-on 5 percig majd 42 °C-on 60 percig majd 70 °C-on 15 percig volt a gépben. Az eredmény a következő lépésben felhasználható cDNS.

#### **4.5. Kvantitatív Polimeráz láncreakció**

A hormonreceptoroknak mennyiségi vizsgálatára qPCR méréseket alkalmaztunk az Állatorvostudományi Egyetem Élettani és Biokémiai Tanszékének laboratóriumában. A méréseket Real-Time PCR (qPCR), azaz valós idejű polimeráz-láncreakcióval végeztük. Ez a technika lehetővé tette a nagy pontosságú, ciklusokban külön-külön mért PCR termékek mérését. SYBR green-nel érjük el a DNS, vagy kiegészítő szálaknak a megjelölését, amelynek erőssége az amplifikáció és ciklusok előrehaladtával arányosan nőni fog a mintában lévő amplifikálni kívánt szakaszok mennyiségével. Ezen felül a készülék figyeli és beállítja a ciklusok lezajlása során a megfelelő hőmérsékletet is, amely a különböző enzimek és primerek megfelelő működése szempontjából elengedhetetlen. A ciklusszám és a fluoreszcens szignál vizsgálatával tudjuk meghatározni az abszolút nukleinsav mennyiségeket. A fluoreszcens szignál jellemzésére egy úgynevezett áttörési ciklust (Ct) figyelünk, mely azt a ciklust jelzi, ahonnan a fluoreszcens jel exponenciális növekedésnek indult. Mivel a ciklusszám és a kiindulási mennyiség egyenesen arányos, ha Ct értékeit összehasonlítjuk, megtudjuk határozni a nukleinsavak mennyiségét is. Figyelemmel kell lennünk arra, hogy a Ct érték a kiindulási mintánkban lévő célmolekulákkal fordítottan arányos, így, ha kis Ct értéket látunk, az sok kiindulási célmolekulát jelent.

A kapott cDNS mintákból mindegy egyes primer párhoz 2  $\mu$ l-re qPCR (Master SYBRGreen, Hoffmann-La Roche, Bázél, Svájc) volt szükségünk. LightCycler 2.0, F (Hoffmann-La Roche, Bázél, Svájc) készülékkel végeztük az elemzéseket. Primer-BLAST, NCBI primer tervezőjének segítségével választottuk ki az egér primer párokat és ezt 0,2

mM koncentrációban használtuk. A kísérletben 20 µl végtérfogatú oldathoz 2 µl MgCl<sub>2</sub>, 2-2 µl forward és reverse primert (200 nM) illetve 2 µl SYBRGreen-t használtunk. LightCycler PCR termikus készülék segítségével végeztük el a vizsgálatokat, két lépcsős hőmérsékleti protokollt alkalmazva. Először 95 °C-on tartottuk a mintát 10 percig, majd következő lépésként egy 4 lépéses amplifikáció következett, 45 cikluson keresztül, a ciklus paraméterei primer függőek. Az olvadáspont analízist 65 °C-on végeztünk. Akkor elfogadható a mérés teljes mértékben, ha az eredmény egy hőmérsékleti csúcsot mutat, mert ez azt jelenti, hogy nem alakultak ki primer dimerek, amik megzavarták volna a mérést. Végül 40 °C-on 30 másodperces lehűtési ciklus következett.

Az egereken ER- $\alpha$ , ER- $\beta$  esetében és a TR- $\alpha$ , TR- $\beta$  meghatározásához használt primerek szekvenciáit az 1. táblázat tartalmazza, a primereket génbanki referencia szekvenciák alapján a Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) online programmal terveztük. A Ct értékait a Gapdh értékeire (háztartási gén) normalizáltuk. Az mRNS relatív expressziós arányait a  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  módszerrel számoltuk ki.

1. táblázat: qRT-PCR analízishez felhasznált primer szekvenciák

Gén	Irány	Primer Szekvencia 5'-3'
ER $\alpha$	forward	GGA ACT GTC TGC CCA TCG TT
	reverse	GAA CCC AGG GCT GCC TTA C
ER $\beta$	forward	AAC CTT CCT CTT GGG CAT CG
	reverse	TTT CAT CCG GTT CTC CCA CC
TR $\alpha$	forward	ACC GCA AAC ACA ACAT TCC G
	reverse	GGG CCA GCC TCA GCT AAT AA
TR $\beta$	forward	CGA GGC CAG CTG AAA AAT GG
	reverse	CTC AGC ACA CTC ACC TGA AGA
PPAR- $\gamma$	forward	TTG GTG GGA TTG TGT CTC GG
	reverse	GGC CAA GAT CTC ACA GTG CT
Gapdh (háztartási gén)	forward	GAT GCG CAA AGG TAT GCA CC
	reverse	TAT CAG TTC GGA GCC CAC AC

#### **4.6. Statisztikai elemzés**

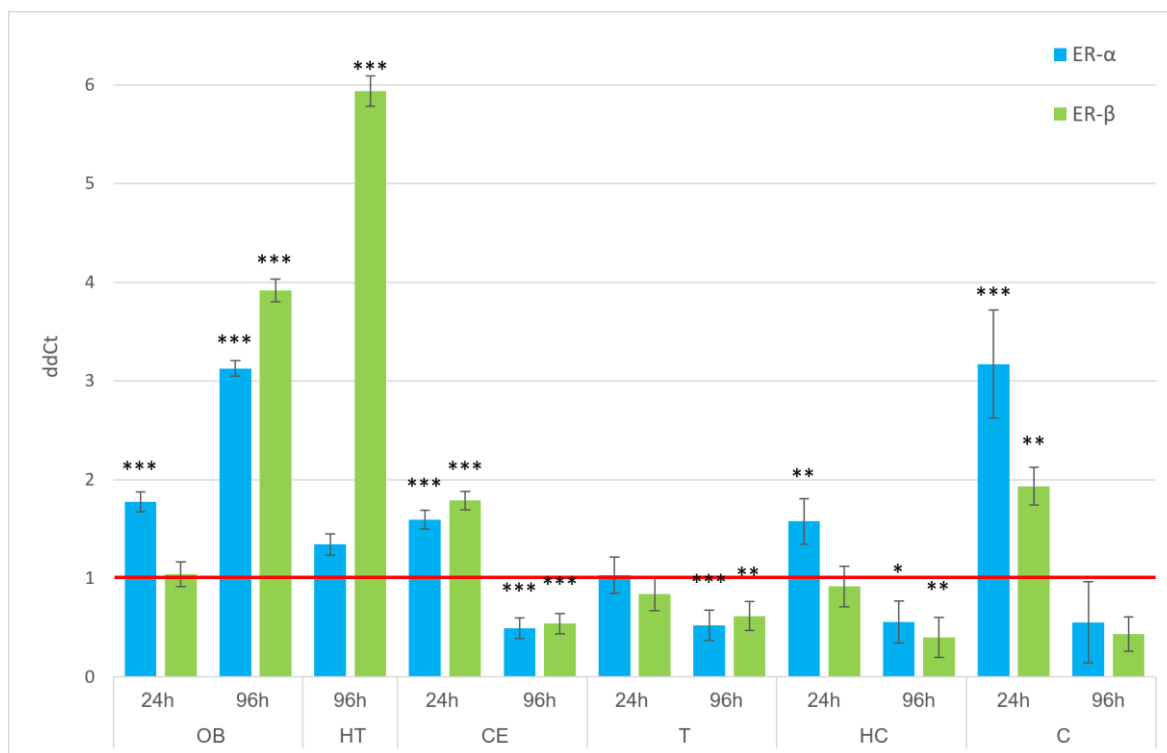
A kutatás statisztikai analízisét az Állatorvostudományi Egyetem, Biomatematikai Tanszéke korábbi útmutatásai alapján végeztük. Az elemzés során a statisztikai kiértékeléshez minden esetben, három független mérés mintája került feldolgozásra. A statisztikai elemzéseket GraphPad Prism 5. verziója (GraphPad Software, San Diego, Kalifornia, USA) segítségével, egyutas ANOVA és Bonferroni utóteszt alkalmazásával végeztünk. A próbák során  $p < 0,05$  szignifikancia szintet alkalmaztunk.

## 5. EREDMÉNYEK

Az eredményeinket első megközelítésben a receptorcsaládok (ER, TR, PPAR) szerinti bontásban mutatjuk be (4.1-4.3 alfejezet). Az egyes receptorcsaládokon belül egymáshoz és a kontroll értékhez viszonyítva tüntettük fel az egyes agyrégiókhoz (OB, HT, CE, T, HC, C) tartozó expresszió-változásokat. A második megközelítésben pedig az egyes receptorok transzkripcióváltozását az agyrégiók szerinti csoportosításban is elemeztük (5.4 alfejezet).

### 5.1. Ösztrogén receptorok mRNA mennyiségének változása

A két ER receptor ( $\alpha$ ,  $\beta$ ) expresszióját az agyrégiók szerint és az egyes inkubációs eljárások függvényében ábrázoltuk (3. ábra). Az így kapott eredményeket a kontroll csoportnál kapott eredményekhez viszonyítottuk (az ábrán a jobb láthatóság érdekében piros vonallal jelenítettük meg a normalizált eredményeket).



3. ábra: Különböző agyrégiókban mért ER mennyiségi változása MMA Str eljárással fejlesztett füst hatására. A piros vonal a kontroll értéket jelzi, amit GAPDH-val normalizált eredmény alapján ábrázoltunk. Bulbus olfactorius (OB), Hypothalamus (HT), Cerebellum (CE), Thalamus (T), Hippocampus (HC), Cortex (C). ddCt=Delta-Delta-Ct (relatív expressziós ráta).  $p < 0.001$  \*\*\*/ $0.01$  \*\*/ $0.05$  \*

A szubakut (96h) hatás leginkább a HT és az OB-ban eredményezte a receptorok transzkripciójának megsokszorozódását. Az OB területén az akut esetben az ER- $\alpha$  receptor expressziója szignifikánsan nőtt a kontrollhoz képest, míg az ER- $\beta$  stagnált, azonban a szubakut hatás folyamán, az ER- $\beta$  receptor meghaladta az ER- $\alpha$  változását, még úgy is, hogy mindkét receptor a kontrollhoz képest több mint, háromszoros génexpresszió emelkedést mutatott, amely mindkét esetben szignifikáns volt.

A HT területéből, az akut csoport mintáiból nem sikerült eredményeket kinyerni, mert technikai okoknál fogva mintavesztés történt. A szubakut eredmények közül nagyon jelentős génexpresszió növekedést tapasztaltunk az ER- $\beta$  receptorban, amely közel hatszoros növekedést mutatott, míg az ER- $\alpha$  transzkripciója csak kis mértékben változott.

A C területén egy érdekes minta rajzolódott ki. Az eredmények azt mutatják, hogy ebben az agyrégióban az akut hatás eredményezte a receptor-gének transzkripciójának szignifikáns növekedését, különösen az ER- $\alpha$ -ét. Ezzel ellentétben a szubakut eredményeink esetében csökkenést tapasztaltunk mindkét receptor tekintetében (az átlagértékek a kontrollhoz viszonyítva közel felére csökkentek), azonban a változások nem érték el a szignifikanciaszintet. Ezt a tendenciát a CE területén is megfigyelhetjük, bár ebben az esetben inkább az ER- $\beta$  receptorok mutatják a nagyobb eltéréseket a kontrollhoz és ER- $\alpha$ -hoz képest, ugyanakkor mindkét eredménypár (24 és 96h) is szignifikánsan változott.

A T régióban mind az akut, mind a szubakut hatásra a receptorok génexpressziója a kontroll alatt maradt. A szubakut hatások eredményeképpen azonban mindkét receptor szignifikáns génexpresszió változást mutatott, az ER- $\alpha$  enyhén még az ER- $\beta$ -ál is jelentősebb. A HC területén, csak az ER- $\alpha$  mutatott szignifikáns emelkedést a kontrollhoz képest az akut csoportban, az ER- $\beta$ , illetve a szubakut csoportokban mindkét receptor mRNS mennyisége jelentősen a kontroll érték alatt maradt.

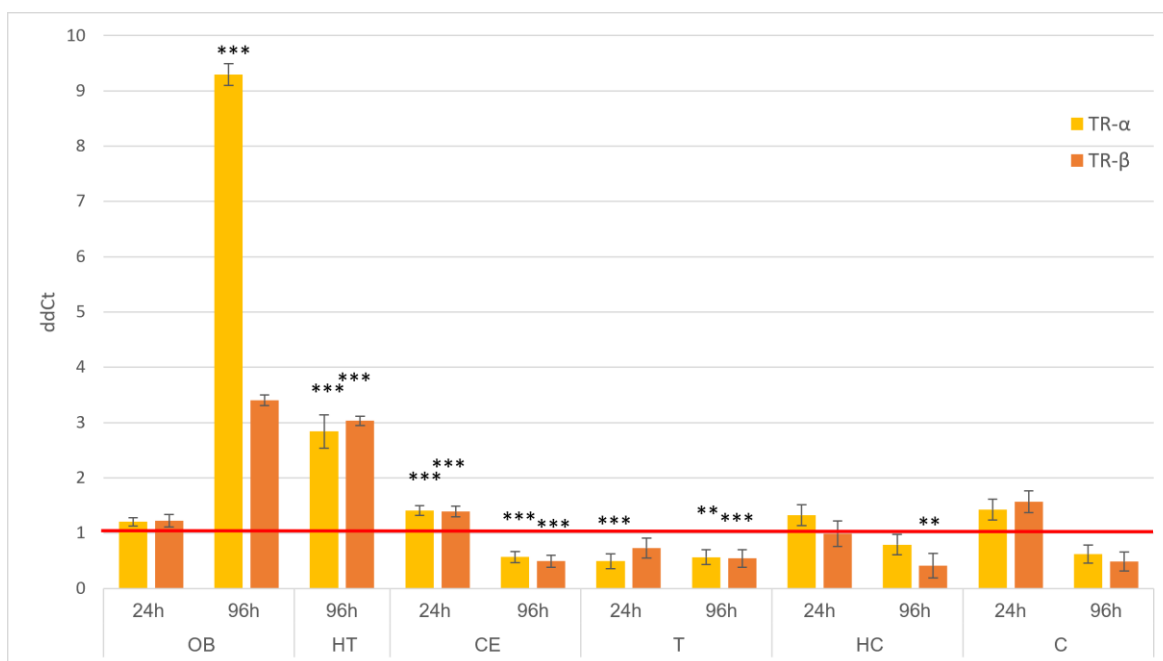
## **5.2. Pajzsmirigyhormon receptorok mRNS mennyiségének változása**

A két TR receptor ( $\alpha$ ,  $\beta$ ) expresszióját az ER receptoroknál alkalmazott ábrázolási mód szerint mutatjuk be (4. ábra).

A pajzsmirigy receptorcsalád transzkripciója az ösztrogén-receptorokhoz hasonlóan az OB és HT-ban ugrik meg szignifikánsan, ezen belül is a szubakut hatásokra. Az OB-nál a TR- $\alpha$  receptorok számában közel kilencszeres növekedést figyelhetünk meg. Az akut kitétség során, csak minimális változást tapasztaltunk. A HT-ban bár nincs akkora

növekedésváltozás, mint az ösztrogén-receptoroknál a szubakut csoportokban, itt is jelentős génexpresszió növekedést figyeltünk meg, amely közel háromszoros a TR- $\beta$  és a TR- $\alpha$ -nál is.

A C területén az ER-családnál megfigyelt tendencia rajzolódik ki, miszerint az akut esetben növekedést, a szubakut esetben csökkenést kaptunk, de jelen esetben egyik érték sem mutatott szignifikáns változást. Ez a trend a CE-ben ugyanúgy megfigyelhető – és egyúttal megfeleltethető az ER-ek esetében tapasztaltnál – mind az akut, mind a szubakut hatásra szignifikanciát mutat.



4. ábra: Különböző agyrégiókban mért TR mennyiségi változása MMA Str eljárással fejlesztett füst hatására. A piros vonal a kontroll értéket jelzi, amit GAPDH-val normalizált eredmény alapján ábrázoltunk. Bulbus olfactorius (OB), Hypothalamus (HT), Cerebellum (CE), Thalamus (T), Hippocampus (HC), Cortex (C). ddCt=Delta-Delta-Ct (relatív expressziós ráta).  $p < 0.001$  \*\*\*/ $0.01$  \*\*/ $0.05$  \*

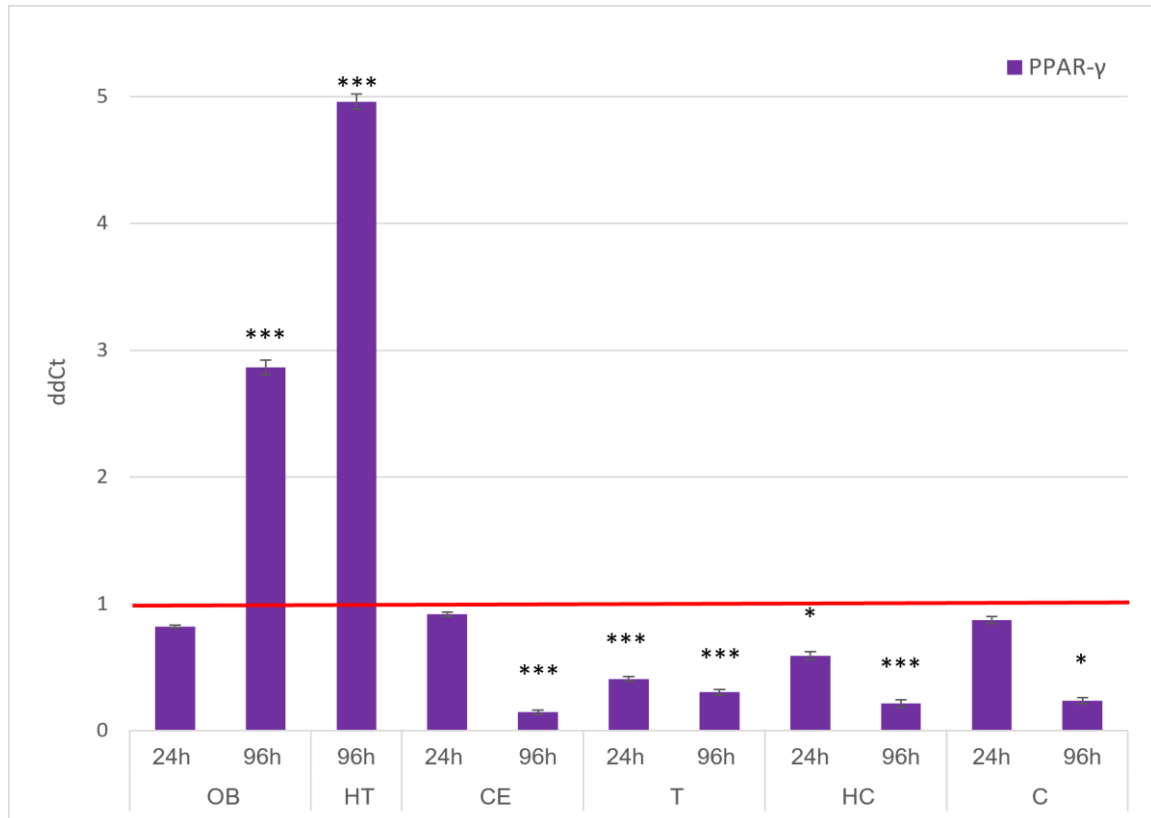
ER-hez részben hasonlóan, a T-ben szintén mRNS-mennyiség csökkenést tapasztalunk mind akut, mind szubakut inkubációs expozíciónál. Akut esetben a TR- $\alpha$  expressziója változik szignifikánsan. Szubakut esetben azonban a TR- $\beta$  nagyobb mértékben változik, mint a TR- $\alpha$ , azonban a változás mindkét esetben jelentős.

A csökkenést a HC területén hasonló tendencia jellemzi, mint a T-ben, bár jelen esetben az akut csoportban a TR- $\alpha$  kis mértékben meghaladja a kontroll csoportot, a TR- $\beta$  pedig közel azonos értékkel rendelkezik. Szubakut esetben a TR- $\beta$  változás szignifikáns, de ezek csak úgy, mint a CE, T és C területén, a kontrollcsoport értéke alatt maradnak.

### 5.3. PPAR- $\gamma$ mRNS mennyiségének változása

A PPAR- $\gamma$  expresszióját szintén az ER receptoroknál alkalmazott ábrázolási mód szerint mutatjuk be (5. ábra).

A PPAR- $\gamma$  receptorcsaládnál szintén az OB és HT területén látjuk a jelentős génextpresszió-emelkedését. Jelen esetben azonban csak ez a két terület az, amely szubakut hatásra szignifikáns növekedést mutat a kontroll csoporthoz képest.



5. ábra: Különböző agyrégiókban mért PPAR- $\gamma$  mennyiségi változása MMA Str eljárással fejlesztett füst hatására. A piros vonal a kontroll értéket jelzi, amit GAPDH-val normalizált eredmény alapján ábrázoltunk. Bulbus olfactorius (OB), Hypothalamus (HT), Cerebellum (CE), Thalamus (T), Hippocampus (HC), Cortex (C). ddCt=Delta-Delta-Ct (relatív expressziós ráta).  $p < 0.001$  \*\*\*/0.01 \*\*/0.05\*

Az OB területén az akut hatást követően a receptor-expresszió a kontroll érték alatt marad, szubakut kitettségnél azonban közel háromszorosára nő a kontrollhoz viszonyítva. A HT esetében, bár az akut eredményeket itt sem tudtuk mérni, a szubakut inkubációs időt követően a receptor transzkripció közel ötszöröse a kontrollnak.

Bár a tendencia a CE és C területén ugyan olyan, mint az előző két receptorcsaládnál, azaz az akut esetben a receptor-expresszió nagyobb – jóllehet nem éri el a kontroll szintjét – majd szubakut esetben jelentős a csökkenés.

A csökkent értékek között a T-ban, nincs nagy eltérés a két inkubációs csoport között, azonban mind az akut, mind a szubakut mRNS mennyiség a kontroll érték felére csökkent. A HC területén sem érik el a csoportok a kontroll értéket ebben az agyrégióban. Akut esetben a receptorok enyhébb mértékben mutatnak transzkripciós változást csökkenő irányban, mint szubakut hatásra.

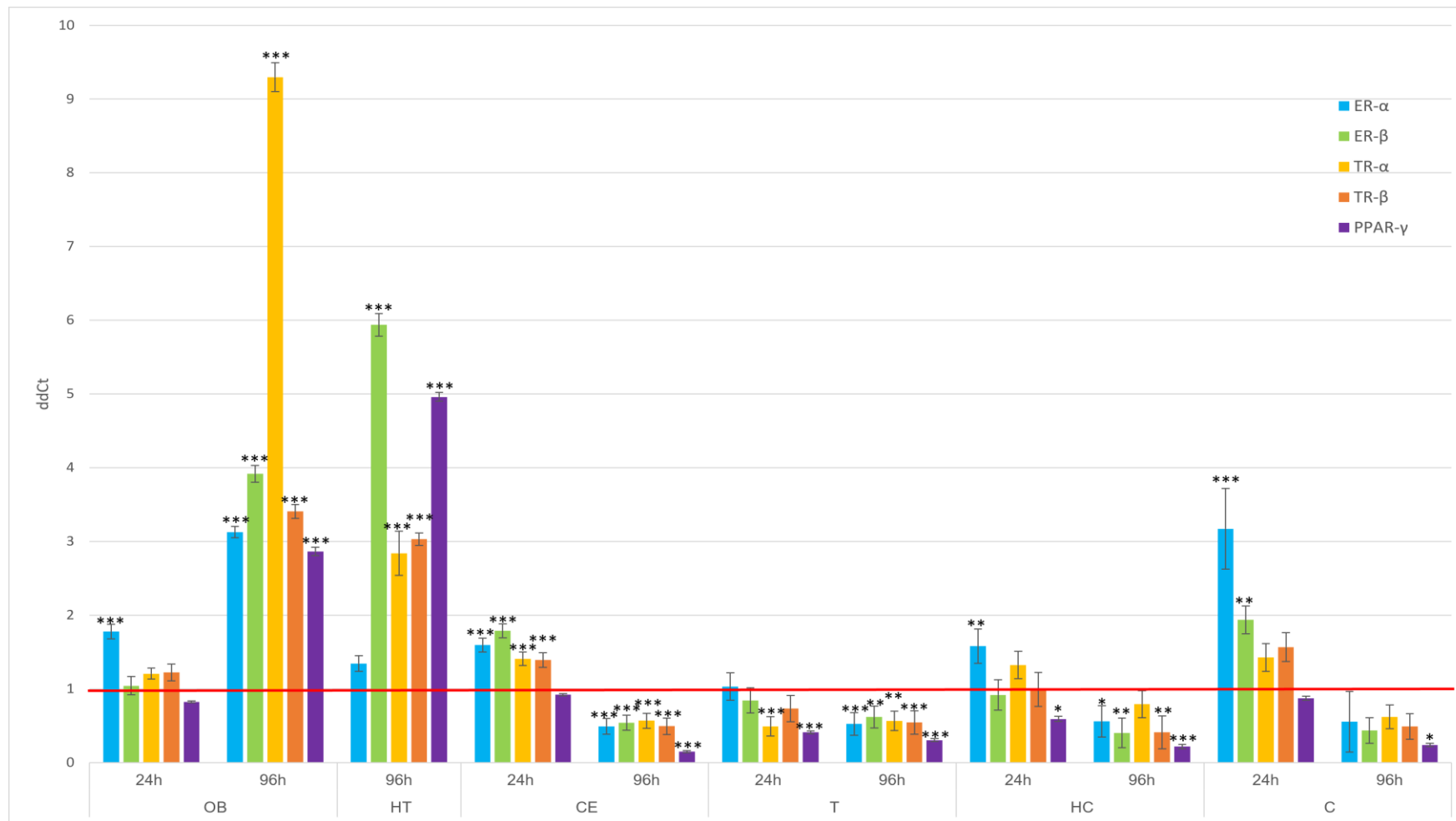
#### **5.4. Az eredmények összesítése agyrégiók szerint**

Annak érdekében, hogy az egyes receptoroknál tapasztalt génexpresszió-változásokat az agyrégiókon belül egymással is össze tudjuk vetni, a fent már bemutatott eredményeket agyrégiókénti bontásban is elemeztük (6. ábra).

Általánosan megfigyelhető, hogy a legerősebb génexpresszió növekedéseket főleg a 96h csoportok mutattak az OB és HT területén. A többi agyrégióban azonban a szubakut eredmények csökkenést eredményeztek. Ez a csökkenés főleg az akut hatásokkal összevetve jelentős, még akkor is, ha azok nem mutatnak olyan nagy génexpressziónövekedést a kontrollhoz képest, mint a szubakut OB és HT eredményei.

Ezen eredmények közül az OB-ban, bár 24h inkubáció után is kapunk szignifikánsan megemelkedett értéket, a leginkább szembevetendő expressziós változások a kitétség után 96h elteltével a TR- $\alpha$  receptoroknál. Az OB területén a szubakut kitétség esetében minden receptor transzkripciós emelkedése jelentkezik. Ez azért meglepő, mert a belélegzés útján a régió tekintetében közvetlen hatást feltételeztünk, ugyanakkor a génexpressziós változások mégis késleltetve jelentkeznek más agyrégiókhoz viszonyítva. A HT-ban szintén a 96h csoportoknál figyelhető meg a receptor-génexpresszió jelentős növekedése. A vizsgált agyrégiók közül kiemelendő a HT, amely a vér-agy gáton keresztüli kommunikációban betöltött fontos szerepe miatt központi jelentőséggel bír kutatásunkban. Ebben a régióban minden receptor-génexpresszió, bár változó mértékben, de megemelkedett, így a fém-oxid részecskék hatása jelentősnek tekinthető.





6. ábra: Különböző agyrégiókban mért ER, TR, PPAR mennyiségi változása MMA Str eljárással fejlesztett füst hatására. A piros vonal a kontroll értéket jelzi, amit GAPDH-val normalizált eredmény alapján ábrázoltunk. Bulbus olfactorius (OB), Hypothalamus (HT), Cerebellum (CE), Thalamus (T), Hippocampus (HC), Cortex (C). ddCt=Delta-Delta-Ct (relatív expressziós ráta).  $p < 0.001$ \*\*\*/ $0.01$ \*\*/ $0.05$ \*

Az emelkedések és a kezeléstől eltelt idő mértéke a C-ben, ellentétben az OB és HT-ban megfigyelt változásokkal a 24h (akut) eredmények bizonyultak a kontrollhoz képest magasabbnak, de csak az ER- $\alpha$ , $\beta$  mutatott szignifikáns eltérést. Ezen a területen egy fokozott down-regulációt figyelhetünk meg, ami még a hippocampus is megemlítendő, de azokon a régiókon kisebb a két eredménykategória közötti eltérés.

A cerebellum esetén fontos kiemelni azt, hogy akut esetben majdnem minden megfigyelt gén up-regulálódik, majd később, a 96h-s mintákban pedig erős down-reguláció figyelhető meg minden vizsgált gén expressziójában.

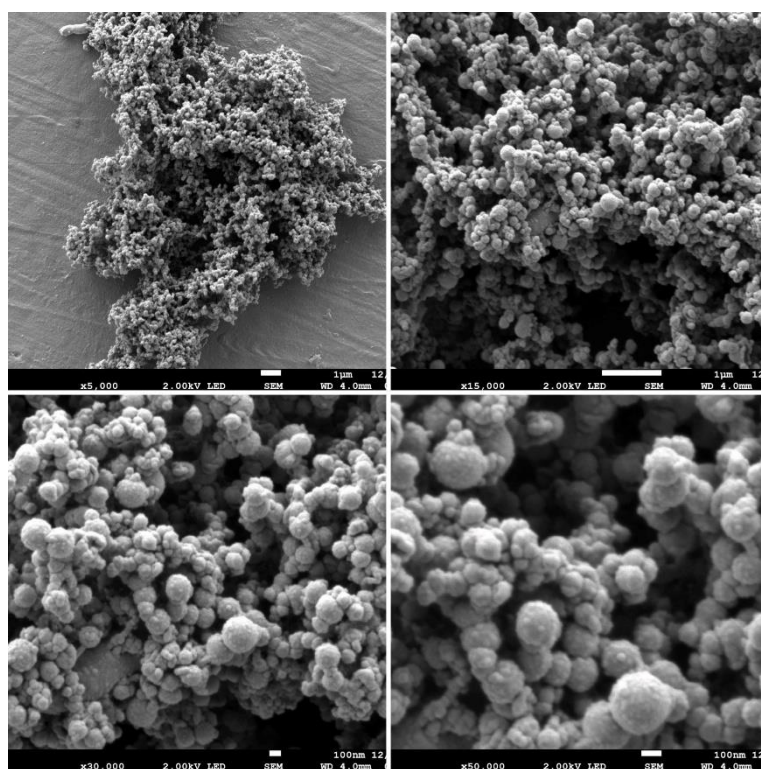
A T régiója a fém-oxidok hatására egy folyamatosan megfigyelhető alacsony receptorexpresszió szintet mutatott mind akut, mind szubakut kitettség mellett.

## 6. MEGBESZÉLÉS

Jelen tanulmányban, azon fémoxidok hatásait vizsgáljuk, amelyek olyan mérettartományba esnek (1-100 nm), hogy a tüdő és a KIR természetes védelmi vonalait könnyedén kijátszva a szervezetben bárhol kifejthetik nemkívánt hatásukat. Előkísérleteink során az általunk fejlesztett füst-nanorészecskék mérettartományának meghatározására elektronmikroszkópiás képalkotó eljárást alkalmaztunk (7. ábra).

Napjainkban a technológia rohamos fejlődésével, egyre több helyen találkozhatunk ezekkel a részecskékkel termékként vagy melléktermékként a vegyipartól az élelmiszeriparig. A szervezetbe bekerültek a fém-oxid részecskék szövetspecifikus módon felhalmozódhatnak, ezáltal kumulatív toxicitást is kifejthetnek. Eloszlásukon, akkumulációjukon túl és ezzel szoros összefüggésben természetszerűen hatásmechanizmusuk is függ az érintett, avagy az expozíciójuknak kitett szövettípustól. E tekintetben sem eloszlásukat, sem pedig sejtszintű vagy molekuláris hatásmechanizmusukat egyáltalán nem, vagy csak rendkívül sporadikusan vizsgálták a központi idegrendszer funkcionálisan elkülöníthető területein.

Az általunk fejlesztett hegesztőfüstben jelenlévő fém-oxidok minőségi és mennyiségi összetételét bár kutatócsoportunk már meghatározta [31] jelen munkánk során hatásaikat együttesen, az egyes komponenseket nem elkülönítve vizsgáltuk. A füstből felszabaduló vegyületek mennyiségi jelenlétét az egyes agyrégiókon belül nem vizsgáltuk, lévén az nagyobb mintamennyiséget követelt volna meg, erre azonban nem volt technikai lehetőségünk, figyelembe véve a modellállat agyrégióinak rendkívül kis méreteit. A natív füst vizsgálatát az is indokolta, hogy a levegőben terjedő fém-oxid részecskék általában nem elkülönült formában találhatók meg, összetételük, bár szűk határok között, de dinamikus változik, ezért az együttes hatásuk elemzése relevánsabb képet ad a vizsgált technológia tekintetében.



7. ábra: A kutatásunk során alkalmazott füst-részecskék izolált halmaza 5-50 000 nagyítás mellett Dr. Máthé Domonkos által készített elektronmikroszkópos felvétele alapján.

### 6.1. Az ösztrogén receptorok mennyiségi változásaiból vélhető következmények

Az irodalomból ismerten mind *in vivo*, mind *in vitro* vizsgálatok alátámasztják az ER neuroprotektív folyamatokban betöltött szerepét, többek között a neurodegeneratív elváltozások kapcsán jellemzően fellépő lipidperoxidáció,  $\beta$ -amiloid plakkképződés és glutamát excitotoxicitás hatásával szemben. Mindezen túl az ER izoformák eltérő folyamatokat közvetítenek, miszerint az ER- $\beta$  leginkább az agy fejlődésében és homeosztázisának fenntartásában játszik szerepet míg az ER- $\alpha$  főleg a sejt szintű káros hatások ellen, a neuroprotektációban kialakulásáért felelős [32].

A jelen eredményeinkben a szubakut hatás az OB és HT területén szignifikáns ER génexpresszió-növekedést eredményezett, ami részben egy lokális, de a neuronokra általános érvényű neuroprotektív aktiválódást sejtet.

A HT területén közel hatszoros növekedést látunk az ER- $\beta$  esetében. Az ösztrogén szignalizációs út HT-beli szerepének ismeretében felvetődik a kérdés, hogy a füst, illetve a belőle felszívódó fém-oxidok milyen módon, milyen irányban módosíthatják a szervezet egészének homeosztázisát reguláló, az energiaháztartásért és az alapvető

anyagcsere-folyamatokért felelős KIR-beli szabályzófunkciókat [33]. Korábbi kutatásunkból ismeretes, hogy a jelen kísérlet során gerjesztett füst, jelentős mennyiségben tartalmaz mangán-oxidokat [31]. Ezek az oxidok főleg a bazális ganglionokban hajlamosak akkumulációra, ahol erőteljes gyulladási folyamatokat vált ki. Hasonló mangánfelhalmozódás és talán hasonló hatás feltételezhető a bazális ganglionokkal szoros funkcionális és anatómiai kapcsolatban álló HT területére vonatkozóan is [34] ahol jelentős ER génexpresszió-növekedést figyeltünk meg, ami többek között a lokális gyulladást előidéző folyamatokkal szembeni protektív reakciókkal állhat kapcsolatban.

Az OB területére, a fém-oxidok két útvonalon is eljutnak; közvetlenül belélegzéssel, illetve közvetett módon, a véráram útján [35]. A jelenlegi eredmények mind akut, mind szubakut vonatkozásban jelentős (kivéve 24h ER- $\beta$ ) génexpressziós növekedést mutattak, ami feltételezhetően összefüggésbe hozható neuroprotektív események beindulásával. Az akut expresszióhoz képest a szubakut (késleltetett) expozíció még további 1,5-2-szeres expresszió-növekedést jelez (ER- $\beta$ ), és az ER- $\alpha$  is markánsan megemelkedik. Mindez arra utal, hogy a fém-oxid részecskék bejutási útvonala főleg a vérárammal (a respirációsnál késleltetettebb, nem direkt úton) történhet.

Neurodegeneratív folyamatok kapcsán kimutatták, hogy az ER- $\alpha$  szignalizációs útvonalának aktivációja (ezzel együtt az ER- $\alpha$  expresszió növekedése) csökkenti az e körképek háttérében álló, a gyulladási folyamatokat súlyosbító mikrogliális túlműködést [26]. Ennek fényében releváns lehet a jövőben a HT és OB területén megvizsgálni a mikrogliia-aktivációt, hogy az összhangban van-e az ezen a két területen tapasztalt megnövekedett ER- $\alpha$  expresszióval.

Az ER-transzkripció fokozódása arra enged következtetni, hogy a belélegzés útján bekerülő fém-oxid részecskék, az érintett területeken – főleg OB, HT – felborítják az idegsejtek homeosztázisát. Hosszútávú expozíció esetén a KIR strukturális és funkcionális károsodásához vezethet, valamint a HT közvetítésével akár a szisztémás anyagcsere-folyamatokat, energiaháztartás regulációját is károsan befolyásolhatják. Ezt alátámasztani látszik, az első sorban a gyulladási folyamatok kapcsán, a ER-kal párhuzamosan aktiválódó PPAR- $\gamma$ -útvonal nálunk is tapasztalt serkentődése [25].

## 6.2. A pajzsmirigy receptorok változásából adódó lehetséges élettani hatások

Közismert, hogy a pajzsmirigyhormon-receptorok a szervezet metabolikus folyamatainak mediálásában, az energiahomeosztázis regulálásában, a szervek és szövetek fejlődési, érési, differenciálódási folyamataiban játszanak központi szerepet [36].

A TR családon belül, az egyes izoformák expressziója és az általuk közvetített folyamatok mibenléte szöveti különbséget mutat. Bár a TR- $\alpha$  és TR- $\beta$  egymást kiegészítő funkciókkal rendelkeznek, kimutatták, hogy a TR- $\alpha$  nagyobb mennyiségben van jelen az agyszövetben, míg a TR- $\beta$  leginkább a vese és pajzsmirigy szövetállományában, de a KIR-ben is kimutatható. Emellett a TR- $\beta$  funkciói közül, a legkiemelkedőbb a hypothalamus-hypophysis-thyroid tengely kommunikációjában betöltött szerepe, amellyel a pajzsmirigyhormon-háztartás homeosztázisában központi jelentőségű kapocs a KIR és a szervezet között. Ezzel szemben a TR- $\alpha$  jelentősége, az agyszövet energiaellátottságában bekövetkező ingadozások kompenzációjában áll. Mindkét TR receptor közös tulajdonsága, a PPAR- $\gamma$ -val való fiziológiai antagonizmusa, azaz a PPAR- $\gamma$ -nak a lipidraktározásra irányuló funkciójának ellensúlyozása energiefelszabadítás formájában [37].

Eredményeinket megfigyelve, az OB területén, szubakut esetben láthatunk egy igen szignifikáns TR- $\alpha$  génexpresszió növekedést, amely a többi receptor szintén szignifikáns emelkedése mellett is kiugró mértékű. Ebből arra a következtetésre jutottunk, hogy adaptív folyamatok indulhatnak be a fent bemutatott, ER- és PPAR- $\gamma$ -mediálta folyamat fokozott energiaigényének fedezésére. A HT esetében, a két TR izoforma hasonlóan szignifikáns emelkedést mutat, ahhoz hasonlóan, mint amit szubakut expozíció kapcsán tapasztaltak. A CE esetében a TR génexpresszió szintén növekedést mutatott, amely ellentétes hatás a hasonló körülmények között, de arzén eredményeként fellépő TR- $\beta$  expressziócsökkenéssel [38].

A CE-beli TR csökkenése szempontjából fontos kiemelni, hogy a pajzsmirigy hormonok a Purkinje-sejtek differenciálódásában és normál működésükben is jelentős szabályozó funkciókat töltenek be [36]. E jelenséget szisztémás szinten tekintve, a CE-ban kialakult szubakut eredményeknél látható génexpresszió-csökkenés a Purkinje-sejtek érintettsége révén ataxiás tünetek megjelenésével társulhat [39]. A receptor-génexpresszió ebbéli csökkenése tehát hosszútávon mozgásszervi tünetek megjelenését eredményezheti, amit alátámaszt a szakirodalom által rég leírt jelenség, mely szerint fém-oxidok mozgásszervi tünetek kiváltói olyan neurodegeneratív kórképek kapcsán, mint a PD vagy a manganizmus [34].

### 6.3. A PPAR- $\gamma$ receptorok változásából eredő élettani hatások

A HT területét tanulmányozva bebizonyították, hogy a PPAR- $\gamma$  kulcsfontosságú szerepet játszik az intracelluláris metabolizmusok szabályozásában, főleg a zsír- és a glükóz anyagcserében [40]. Ezzel együtt, a PPAR- $\gamma$  jelátviteli útja a szisztémás zsíryanycsere szabályozásában is kulcsfontosságú, amit az is jól fémjelez, hogy a PPAR- $\gamma$  legnagyobb mértékű expressziója az adipocitákban mutatható ki, expressziója inzulin-szenzitív, és a lipiddepók növekedését közvetíti [25].

Ezen általános hatások mellett, számunkra jelentősebb a gyulladós folyamatokban betöltött anti-inflamatorikus szerepük. Expressziójuk fokozottan csökkenti a ROS mennyiségét, illetve blokkolja az interleukin (IL)-1,-6 és TNF- $\alpha$  termelését az immunrendszer és az idegszövet sejtípusaiban [41]. Eredményeinkből láttuk, hogy az OB és HT területén, az ER és TR-hez hasonlóan, a PPAR- $\gamma$  génexpressziója is jelentősen megemelkedett a füst hatására. A HT területén bekövetkező szignifikáns transzkripció fokozódás, csak úgy, mint az ER- $\beta$  növekedése esetében, szintén párhuzamot mutathat a mangán-oxidok megemelkedett jelenlétével [42]. Ezen fém-oxidok bizonyítottan gyulladást váltanak ki [31] és az erre bekövetkező válaszreakciót, a kutatásunkban alá is támasztotta a PPAR- $\gamma$  és ER- $\beta$  génexpresszió növekedése. A PPAR- $\gamma$  mRNS mennyiségének fokozódása olyan válaszreakciót eredményezhet, hogy az érintett agyterületeken fellépő gyulladós reakciókat mérsékelheti, késleltetheti a neurodegenerációt [43].

*In vivo* és *in vitro* tanulmányok kimutatták a PPAR- $\gamma$  egerekben gyulladáscsökkentő hatásával védelmi szerepet tölt be a velőshüvely-szétesés (demielinizáció), AD és PD esetében is. Megfigyelték, hogy a non-steroid gyulladáscsökkentő szerek alkalmazása ilyen kórképek esetében hat a receptorok aktivációjára is, így azt feltételezik, hogy ezen szerek protektív hatása a PPAR- $\gamma$  közvetítésével valósulhat meg [44].

Azon területeken, ahol egy fokozott génexpresszió csökkenés figyelhető meg, ott a gyulladáscsökkentő hatás kifejtése elmaradhat, ezzel krónikus gyulladás léphet fel. Kulcsfontosságú szerepet tulajdonítanak a PPAR- $\gamma$ -nak a neuronok növekedésének serkentésében, illetve csökkentik a sejtek apoptotikus folyamatait is [45] Mivel az eredményeket figyelembe véve a legtöbb agyterületen (CE, T, HC, C) a PPAR- $\gamma$  expressziója jelentősen lecsökken, így mind a védelmi funkció aktiválása, mind a neuronok regenerációja elmaradhat. Ennek alapján feltételezhető lehet, hogy – legalábbis a PPAR- $\gamma$  tekintetében – ezen agyterületek a gyulladós folyamatoknak sokkal inkább kitettek, így a

fünt említett, a mozgáskoordinációt, finommotoros vezérléseket érintő tünetek legalább részben e régiók károsodására vezethetők vissza [46].

#### **6.4. A receptor-regulációs hatások időbeli- és agyrégiók szerinti eltérései**

A kutatásunk eredményeiből egyértelműen láthatjuk, hogy a legjelentősebb receptorális génexpresszió növekedések az OB és HT területén következtek be a szubakut csoportokban. Az OB területén, ahol a fém-oxidok bejutási útvonalának lehetséges módjai a mai napig nem egyértelműek, a mi eredményeink leginkább a véráram útján történő indirekten bekerülést támasztották alá. Ezt részben a C, a T és a HC területe kapcsán kirajzolódó adatok is alátámasztani látszanak, ahová egyébként a fém-oxid részecskék kizárólag a véráram útján juthatnak be. Kísérleteink során ezekben az agyrégiókban az akut inkubáció esetén jelentkezett markánsabb expresszióváltozás (bár eltérő irányultsággal), ami azt sugallja, hogy a fém-oxidok 24 órával az expozíció után még nem, vagy csak szerényebb reakciót váltottak ki, míg 96h elteltével már markáns változásba csapott át. Mivel a C, a T és a HC területén kapott időbeli lefutás egyezni látszik a HT és OB területén látottal, ezért úgy véljük, hogy a fém-oxidok mind az öt területre hozzátvetőlegesen azonos ütemben, a vérpálya útján jutnak el.

A mangán-oxidok vér-agy gáton történő átjutását elsősorban a transferritin által közvetített transzportfolyamatoknak tulajdonítható, majd a bazális ganglionokban felhalmozódva gyulladáshoz vezető folyamatokat váltanak ki [34]. A HT-ban az általunk megfigyelt receptor-génexpressziók mennyiségi változásai összefüggésben lehetnek a bazális ganglionokat érintő folyamatokkal, ugyanakkor fel kell tételeznünk, hogy a fém-oxidok a HT területére, az ott található, módosult (más elnevezéssel „szivárgó”) struktúrájú vér-agy gáton keresztül közvetlenül is beléphetnek a vérpályából. A HT területén továbbá kimutatták, hogy a mangán fokozza a glükóz oxidatív metabolizmusát és ezáltal a ROS termelődését, amely folyamatok az agy energiaállapotának megváltozásához vezetnek [42]. Ezeket a folyamatokat alátámasztják az ER- $\beta$ , TR- $\alpha$ - $\beta$  és PPAR- $\gamma$  kapcsán kapott eredményeink, amelyek szignifikáns génexpresszió-növekedést mutattak.

A CE-ben megfigyelt mRNS mennyiségi változásainak irányultsága az időfaktort figyelembe véve rendkívül fontos a következményes tünetek kialakulásának szempontjából. A szubakut csoportokban minden receptor transzkripciós értékei szignifikáns down-regulációt mutattak. Ezeknek következményei súlyos mozgásszervi tünetekben manifesztálódhatnak egy krónikus kitétséget feltételezve. Ilyen tüneteket



figyeltek meg az extrapiramidális pályákat érintő manganizmusnál illetve a PD-nél is. Ezek a tünetek egy jelentős gyulladással járó folyamatból felszabaduló neurotoxikus anyagok hatásainak következményei [47], amelyek ellen, amennyiben az agy védelmi funkciót erősítő receptorai csökkent expressziót mutatnak, idővel nagy valószínűséggel a KIR leépülése következhet be.

A kutatásunkban leírt hormon-receptor génexpressziós változások magasabb szintű biológiai következményei még nem tisztázottak, ezek felmérésére nem vállalkozhattunk jelen vizsgálat keretein belül. Ezen hatások megismeréséhez további kutatások elvégzése szükséges a jövőben.

## 7. ÖSSZEFOGLALÁS

Kutatásunkban a bevont elektródás ívhegesztés (MMA) technológiák alkalmazása során felszabaduló fém-oxid részecskék hatását tanulmányozzuk egér-agy modellen. A kutatás fő irányvonalát képezi a füstből a belélegzés útján a szervezetbe jutó fém-oxid nanorészecskéknek a központi idegrendszerre (KIR) gyakorolt neurodegeneratív hatásának felderítése. A jelen kutatás az ösztrogénreceptorok (ER- $\alpha$ ,  $\beta$ ), pajzsmirigyreceptorok (TR- $\alpha$ ,  $\beta$ ) és peroxiszóma proliferátor-aktiválta receptor-gamma (PPAR- $\gamma$ ) vizsgálatára fókuszál, mivel azt feltételezzük, hogy ezen receptorok expresszióváltozása indukálhatja a degeneratív kórképek kialakulását.

Célunk feltérképezni, hogy miként változik ezen receptorok génexpressziója a füst hatására, és hogy e változások milyen összefüggésbe hozhatóak a felszabaduló fémionok jelenlétével. Mindezzel bővíteni kívánjuk a belélegezhető fém-oxidok sejtélettani folyamatokra gyakorolt hatásáról alkotott ismereteinket, valamint fel szeretnénk hívni a figyelmet az iparban dolgozók védelmére, megfelelő elszívók és maszkok használatának fontosságára.

A kísérleteinkben 4 órás MMA füst expozíciót követően, 24 (akut), illetve 96 óra (szubakut) inkubációs időt alkalmazva történt a mintavételezés a mindkét nembe tartozó 8 hetes BALB/C egerekből. A KIR vizsgálatára mintát vettünk a bulbus olfactorius, a neocortex, a hippocampus, a thalamus, a hypothalamus, és a cerebellum területeiről. A hormonreceptor-expressziót qPCR technikával mértük.

A kontrollhoz viszonyítva a legnagyobb expresszióváltozások a bulbus olfactorius és a hypothalamus esetében jelentkeztek. A szubakut génexpresszió receptor- és agyrégió-függvényében jelentősen változott a kontrollhoz képest, míg az akut eredmények a legtöbb esetben a kontroll értékektől nem különböztek szignifikánsan. A jelenlegi eredményeink arra utalnak, hogy az inkubációs idő nagyban befolyásolja a génexpresszió-változások irányát. Fontos kiemelni, hogy bizonyos agyterületeken az egyes receptorok expressziója eltérő mértékben reagált a fém-oxidok jelenlétére, így ezek a változások nagy valószínűséggel összefüggnek a fémek jelenlétével. Jelen eredményeink alapján kijelenthetjük, hogy a hegesztőfüstben jelenlévő fém-oxid részecskék hatást gyakorolhatnak a KIR bizonyos receptoraira. Ezek a változások egyenes utat jelenthetnek a neurodegenerációs kórképek megjelenéséhez is, bár az egzakt biológiai hatások feltérképezése még további kutatásokat igényel.

## 8. SUMMARY

In this research, the effect of metal oxide particle release during the application of manual metal arc welding (MMA) technologies is appraised using mouse models. The effect of neurodegenerative of metal oxide nanoparticles to enter the body via smoke inhalation is evaluated using evaluation of the central nervous system (CNS). The main focal areas were chosen for this study includes the appraisal of gene expressions in terms of estrogen receptors (ER- $\alpha$ ,  $\beta$ ), thyroid receptors (TR- $\alpha$ ,  $\beta$ ) and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR- $\gamma$ ); it is assumed that changes in the expression of these receptor genes can induce degenerative diseases.

Therefore, this study aims to fill significant knowledge gaps on the effect of inhalable metal oxides on cellular physiological processes through the assessment of potential alterations in the expression of these receptor-genes as a result of welding fumes inhalation; and the evaluation as to how such changes in gene expressions can be associated with the quantitative presence of released metal ions, thus drawing relevance to the health risks of personnel and potential abatement strategies.

Tissue sampling occurred after 24 (acute) and 96 hours (sub-chronic) incubation times using 8-week-old BALB/C mice - of both sexes - exposed to MMA fumes for 4 hours. To examine KIR, samples were taken from the areas of the olfactory bulb, neocortex, hippocampus, thalamus, hypothalamus, and cerebellum. Hormone receptor expression was measured using qPCR techniques.

Results were compared to control samples. It was shown the largest changes in gene expression in the olfactory bulb and the hypothalamus. Furthermore, compared to the control measurements, the absolute sub-chronic exposures significantly changed the gene expression of all five receptors in the examined six brain regions. This was not the case at the acute exposure levels, i.e., gene expressions do not significantly differ from the control values. These results show, for the first time, that specific brain regions impacted by the presence of metals can be identified as well as the deterioration rate and the direction of changes in the gene expression of hormone receptors. In conclusion, metal oxide particles present in welding fumes can have an effect on certain receptors of the CNS, thus potentially leading onto the appearance of neurodegenerative symptoms. Further research is required to explore the relevant biological impacts, e.g., transport of metals to cells, the associated intracellular metabolic pathways.

## 9. IRODALOMJEGYZÉK:

1. Pega F, Chartres N, Guha N, et al (2020) The effect of occupational exposure to welding fumes on trachea, bronchus and lung cancer: A protocol for a systematic review and meta-analysis from the WHO/ILO Joint Estimates of the Work-related Burden of Disease and Injury. *Environ Int* 145:106089. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106089>
2. Fiore S. R. (2006) Hexavalent-Fumes-1. *Weld J*
3. Kovács M. (2019) *Hegesztés*, 14. Műszaki Könyvkiadó Kft., Budapest
4. Uzun O, İnce O, Bakalov V, Tuna T (2012) Massive hemoptysis due to welding fumes. *Respir Med Case Rep* 5:1–3. <https://doi.org/10.1016/j.rmedc.2012.01.001>
5. Jamrozik W, Górká J (2020) Assessing MMA Welding Process Stability Using Machine Vision-Based Arc Features Tracking System. *Sensors* 21:84. <https://doi.org/10.3390/s21010084>
6. Sarkar S, Rokad D, Malovic E, et al (2019) Manganese activates NLRP3 inflammasome signaling and propagates exosomal release of ASC in microglial cells. *Sci Signal* 12:. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aat9900>
7. Dobson AW, Erikson KM, Dobson MA (2004) Manganese Neurotoxicity
8. Gaetke L (2003) Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology* 189:147–163. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(03\)00159-8](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(03)00159-8)
9. Barceloux DG (1999) Nickel. *J Toxicol Clin Toxicol* 37:239–258. <https://doi.org/10.1081/CLT-100102423>
10. Pavesi T, Moreira JC (2020) Mechanisms and individuality in chromium toxicity in humans. *Journal of Applied Toxicology* 40:1183–1197. <https://doi.org/10.1002/jat.3965>
11. Exley C, House ER (2011) Aluminium in the human brain. *Monatshfte für Chemie - Chemical Monthly* 142:357–363. <https://doi.org/10.1007/s00706-010-0417-y>
12. Lewinski N, Graczyk H, Riediker M (2013) Human inhalation exposure to iron oxide particles. *BioNanoMaterials* 14:5–23. <https://doi.org/10.1515/bnm-2013-0007>
13. Rana HK, Akhtar MstR, Ahmed MB, et al (2019) Genetic effects of welding fumes on the progression of neurodegenerative diseases. *Neurotoxicology* 71:93–101. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2018.12.002>
14. Antonini JM, Santamaria AB, Jenkins NT, et al (2006) Fate of manganese associated with the inhalation of welding fumes: Potential neurological effects. *Neurotoxicology* 27:304–310. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2005.09.001>
15. Duruibe JO, Ogwuegbu MOC, Ekwurugwu (2007) Heavy metal pollution and human biotoxic effects
16. Kiebertz K, Kurlan R (2005) Welding and Parkinson disease. *Neurology* 64:2001–2003. <https://doi.org/10.1212/WNL.64.12.2001>
17. Josephs KA, Ahlskog JE, Klos KJ, et al (2005) Neurologic manifestations in welders with pallidal MRI T1 hyperintensity. *Neurology* 64:2033–2039. <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000167411.93483.A1>

18. Shoeb M, Mustafa GM, Kodali VK, et al (2020) A possible relationship between telomere length and markers of neurodegeneration in rat brain after welding fume inhalation exposure. *Environ Res* 180:108900. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.108900>
19. Attademo L, Bernardini F, Garinella R, Compton MT (2017) Environmental pollution and risk of psychotic disorders: A review of the science to date. *Schizophr Res* 181:55–59. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2016.10.003>
20. Norsted E, Gömüç B, Meister B (2008) Protein components of the blood–brain barrier (BBB) in the mediobasal hypothalamus. *J Chem Neuroanat* 36:107–121. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2008.06.002>
21. Bi S-S, Jin H-T, Talukder M, et al (2021) The protective effect of nano-selenium against cadmium-induced cerebellar injury via the heat shock protein pathway in chicken. *Food and Chemical Toxicology* 154:112332. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112332>
22. Wang D, Zong C, Cheng K (2020) Chicken thalamic injury induced by copper (II) or / and arsenite exposure involves oxidative stress and inflammation-induced apoptosis. *Ecotoxicol Environ Saf* 197:110554. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110554>
23. Li T, Shi T, Li X, et al (2014) Effects of Nano-MnO<sub>2</sub> on Dopaminergic Neurons and the Spatial Learning Capability of Rats. *Int J Environ Res Public Health* 11:7918–7930. <https://doi.org/10.3390/ijerph110807918>
24. Ijomone OM, Ifenatuoha CW, Aluko OM, et al (2020) The aging brain: impact of heavy metal neurotoxicity. *Crit Rev Toxicol* 50:801–814. <https://doi.org/10.1080/10408444.2020.1838441>
25. Jia M, Dahlman-Wright K, Gustafsson J-Å (2015) Estrogen receptor alpha and beta in health and disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 29:557–568. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2015.04.008>
26. Vegeto E, Belcredito S, Eterri S, et al (2003) Estrogen receptor-mediates the brain antiinflammatory activity of estradiol. *Milano*
27. Shughrue PJ, Lane M v, Merchenthaler I (1997) Comparative Distribution of Estrogen Receptor-and-mRNA in the Rat Central Nervous System. Wiley-Liss, Inc
28. Mullur R, Liu Y-Y, Brent GA (2014) Thyroid Hormone Regulation of Metabolism. *Physiol Rev* 94:355–382. <https://doi.org/10.1152/physrev.00030.2013>
29. Liu Y-Y, Brent GA (2018) Thyroid hormone and the brain: Mechanisms of action in development and role in protection and promotion of recovery after brain injury. *Pharmacol Ther* 186:176–185. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.01.007>
30. Staels B, Fruchart J-C (2005) Therapeutic Roles of Peroxisome Proliferator–Activated Receptor Agonists. *Diabetes* 54:2460–2470. <https://doi.org/10.2337/diabetes.54.8.2460>
31. Kóvágó C, Szekeres B, Szűcs-Somlyó É, et al (2022) Preliminary study to investigate the distribution and effects of certain metals after inhalation of welding fumes in mice. *Environmental Science and Pollution Research* 29:49147–49160. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-19234-7>
32. Morissette M, le Saux M, D’Astous M, et al (2008) Contribution of estrogen receptors alpha and beta to the effects of estradiol in the brain. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 108:327–338. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2007.09.011>

33. Krause WC, Rodriguez R, Gegenhuber B, et al (2021) Oestrogen engages brain MC4R signalling to drive physical activity in female mice. *Nature* 599:131–135. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04010-3>
34. Dobson AW, Erikson KM, Aschner M (2004) Manganese Neurotoxicity. *The New York Academy of Sciences* 1012:115–129
35. Werner S, Nies E (2018) Olfactory dysfunction revisited: a reappraisal of work-related olfactory dysfunction caused by chemicals. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology* 13:28. <https://doi.org/10.1186/s12995-018-0209-6>
36. Bernal J. and Nunez J. (1995) Thyroid hormones and brain development. *Eur J Endocrinol* 133:390–398
37. Cheng S-Y, Leonard JL, Davis PJ (2010) Molecular Aspects of Thyroid Hormone Actions. *Endocr Rev* 31:139–170. <https://doi.org/10.1210/er.2009-0007>
38. Guan H, Li S, Guo Y, et al (2016) Subchronic Exposure to Arsenic Represses the TH/TR $\beta$ 1-CaMK IV Signaling Pathway in Mouse Cerebellum. *Int J Mol Sci* 17:157. <https://doi.org/10.3390/ijms17020157>
39. Aszalós Z (2007) Some neurological and psychiatric complications in the disorders of the thyroid gland. *Orv Hetil* 148:303–310. <https://doi.org/10.1556/oh.2007.27988>
40. Li Q, Yu Q, Lin L, et al (2018) Hypothalamic peroxisome proliferator-activated receptor gamma regulates ghrelin production and food intake. *Neuropeptides* 69:39–45. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2018.04.002>
41. Vörös P. (2020) A Parkinson-kór protein-7, a peroxiszóma proliferátor aktivált receptor- $\gamma$  és a tímusz sztrómális limfopoietin szerepe gyermekkori cöliákiában. Budapest
42. Just N, Cudalbu C, Lei H, Gruetter R (2011) Effect of Manganese Chloride on the Neurochemical Profile of the Rat Hypothalamus. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 31:2324–2333. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2011.92>
43. García-Bueno B, Madrigal JLM, Lizasoain I, et al (2005) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation decreases neuroinflammation in brain after stress in rats. *Biol Psychiatry* 57:885–894. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2005.01.007>
44. Heneka MT, Landreth GE (2007) PPARs in the brain. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 1771:1031–1045
45. Villapol S (2018) Roles of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma on Brain and Peripheral Inflammation. *Cell Mol Neurobiol* 38:121–132. <https://doi.org/10.1007/s10571-017-0554-5>
46. Cseh K., Palik É., Tóth J., et al (2005) PPAR- $\gamma$ -agonista ligandok az inzulinrezisztencia és a 2-es típusú diabetes kezelésében. *Farmakológiai és klinikai vonatkozások*. Budapest
47. Li S-J, Qin W-X, Peng D-J, et al (2018) Sodium P -aminosalicylic acid inhibits sub-chronic manganese-induced neuroinflammation in rats by modulating MAPK and COX-2. *Neurotoxicology* 64:219–229. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2017.06.012>

## 10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, Dr. Kiss Dávid Sándornak és Dr. Kővágó Csabának, akik szakmai irányításával és nagy türelmével, segítségével lehetővé tette a kutatási témám megvalósulását.

Köszönöm Professzor Dr. Bartha Tibornak, az Élettani és Biokémiai Tanszék vezetőjének, és Professzor Dr. Jerzsele Ákosnak, a Gyógyszertani és Méregtani Tanszék vezetőjének, hogy kutatási témámat befogadta és biztosította a tanszék laboratóriumának használatát.

Köszönet illeti Ősz Zsófiát és Kinálné Szikora Zsuzsannát, a laboratóriumi munkákban nyújtott nélkülözhetetlen útmutatásukért és hatalmas segítségükért.

Végül, de nem utolsó sorban köszönet illeti a családomat és a barátaimat, akik a háttérből végig támogattak.

Ezúton kívánunk köszönetet mondani az NKFIH-nak a 129055 számú FK\_18 pályázati keret által a kutatáshoz adott anyagi támogatásáért.

## NYILATKOZAT

Alulírott Di Gennaro Pósa Kinga Anna nyilatkozom, hogy diplomamunkám, melynek címe Respirábilis fém-oxid belégzés hatása egyes hormonreceptorok agybeli transzkripciójára in vivo egér modellben tartalmi és formai szempontból teljes mértékben megegyezik azonos című, a 2022 évi TDK konferencián szerepelt dolgozatommal.

Budapest, 201. 2023. X. 16

Di Gennaro Pósa Kinga Anna

a hallgató neve és aláírása





**Diplomamunka konzultációs lap állatorvostan hallgatók részére**

A hallgató neve: Di Gennaro Plósz Kinga Anna

Neptun-kódja: QQEFG

A témavezető neve és beosztása: Dr. Kiss Dávid Sándor, egyetemi docens

Tanszék: Élettani és Biokémiai Tanszék

A diplomadolgozat címe: Respirábilis fém oxid belégzés hatása egyes hormonreceptorok agybeli transzkripciójára in vivo egér modellben

**Konzultáció - 1. félév**

	Időpont			Téma/Témavezető megjegyzése	Témavezető aláírása
	Év	Hó	Nap		
1.	2022	04	01	A téma körbejárása (hegesztőgázok)	<i>hbc</i>
2.	2022	04	10	A téma körbejárása (vizsgált hormonreceptorok)	<i>hbc</i>
3.	2022	04	29	Cikkek elemzése	<i>hbc</i>
4.	2022	05	15	TDK felépítésének megbeszélése	<i>hbc</i>
5.	2022	05	28	Hivatkozáskezelés	<i>hbc</i>

Érdemjegy az első félév végén: ..... *5* .....

**Konzultáció - 2. félév**

	Időpont			Téma/Témavezető megjegyzése	Témavezető aláírása
	Év	Hó	Nap		
1.	2022	09	09	Irodalmi összefoglaló átnézése	<i>hbc</i>
2.	2022	09	18	Anyag és módszer átbeszélése	<i>hbc</i>
3.	2022	10	02	Eredmények és megbeszélés áttekintése	<i>hbc</i>
4.	2022	10	10	Dolgozat részletes áttekintése, ábrák véglegesítése	<i>hbc</i>
5.	2022	10	15	Véglegesítés, formai követelmények, helyesírás, nyelvhelyesség, források ellenőrzése	<i>hbc</i>

Érdemjegy a második félév végén: ..... *5* .....

A nyomtatvány a hallgatói és a tanszéki ügyintézői aláírás, valamint az átvétel dátuma nélkül nem érvényes. A konzultációs lap a diplomamunka mellékletét képezi!





A diplomamunka - a szakra vonatkozóan - a Tanulmányi- és Vizsgaszabályzatban, valamint az Útmutató a szakdolgozatok/diplomamunkák készítéséhez című mellékletében leírt követelményeknek megfelel.

A diplomamunka befogadható, védésre alkalmasnak találtam.

.....  
témavezető aláírása

Hallgató aláírása: *P. Gábor Péter Király*

Tanszéki előadó aláírása: ..... Átvétel dátuma: 2023.02.28