

Állatorvostudományi Egyetem Élettani
és Biokémiai Tanszék

A pajzsmirigy- és ösztrogén receptor proteinek expresszióját károsító anyag, a kámfor vizsgálata fejlődő primer kisagyi sejt kultúrán

Készítette:

Haraszi Zsuzsanna

Témavezető:

Jócsák Gergely, PhD hallgató,
Kiss Dávid Sándor, egyetemi adjunktus

Budapest

2016

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	3
Bevezetés	4
A kísérletben használt hormonok élettana.....	4
Ösztrogén:.....	4
Pajzsmirigyhormonok	6
Ösztrogén, tiroxin hatása a központi idegrendszerre:.....	8
Ösztrogén hatása a kisagyra	8
Pajzsmirigyhormon hatása a kisagyra	9
Ösztrogén és pajzsmirigyhormonok egyensúlya.....	9
Endokrin diszruptorok, fitoösztrogének:	10
Kámfor.....	11
Primer kisagyi sejt kultúra	14
Célkitűzések	16
Anyag és módszer	17
Állatok	17
A sejt kultúra létrehozása	17
Kezelések.....	17
Western blot technika	18
Adatelemzés.....	18
Eredmények:	19
ER β receptorok expressziójának változása kezelésekre.....	19
TR α receptorok expressziójának változása kezelésekre.....	20
TR β receptorok expressziójának változása kezelésekre.....	21
Megbeszélés	23
Összefoglalás	28
Abstract	29
Irodalomjegyzék:.....	30
Köszönetnyilvánítás	36

Rövidítések jegyzéke

BERKO	Beta estrogen receptor knockout
CYP450	Citokróom P450 enzimrendszer
D1	I-es típusú dejodináz
D2	II-es típusú dejodináz
D3	III-as típusú dejodináz
DES	Dietil-stilbösztrol
DIT	Dijódtirozin
E1	Ösztron
E2	Ösztradiol
E3	Ösztriol
E4	Ösztetrol
ED	Endokrin diszruptor(ok)
EGF	Epidermal growth factor
Er	Ösztrogén receptorok
ERE	Estrogen response element
FDA	Food and Drug Administration
FSH	Follikulus stimuláló hormon
GABA	Gamma-Aminobutyric acid
GFP	Glial fibrillary acidic protein
GnRH	Gonadotropin releasing hormone
GPR	G-protein kapcsolt receptor
HDL	High-density lipoprotein
IGF-1	Insulin-like growth factor-1

LDL	Low-density lipoprotein
LH	Luteinizáló hormon
LRP2	Low density lipoprotein receptor-related protein
MBC	4-metilbenzilidén-kámfor
MIT	Monojódtirozin
PCR	Polimerase Chain Reaction
POF	Premature ovarian failure
SERM	Selective estrogen receptor modulators
T3	Trijód-tironin
T4	Tetrajód-tironin
TBG	Thyroxine-binding globulin
TBPA	Thyroxine-binding prealbumin
TH	Thyroid hormone(s)
TR	Tiroid receptorok
TRE	Thyroid hormone response element
TRH	Thyrotropin Releasing Hormone
TSH	Thyroid-stimulating hormone
UTI	Urinary Tract Infections

Bevezetés

A kísérletben használt hormonok élettana

Ösztrogén:

Az ösztrogén a fejlődés során nélkülözhetetlen, mindkét nemben termelődő, számos szervrendszerre ható hormon. Szerepe van a másodlagos nemi jellegek kialakításában, a nemi működés beindításában és fenntartásában, a méhnyálkahártya vastagodásában,

csontképződésben, lipid forgalomban, a véralvadási folyamatokban, fehérje szintézisben, bél mozgásban, a légútyagocskák funkciójában (elsősorban rágcslókban bizonyítottan, de feltehetően emberben is), illetve hímeKben a sperma érésében. A legpotensebb ösztrogén molekula a 17 β -ösztradiol (E2), mely egy szteránvázás, lipofil hormon. Emellett termelődik még a szervezetben kisebb mértékben ösztron(E1), ösztriol(E3) és ösztetrol(E4) is. Kis arányban oldódik vízben is, ezért minimális mennyiségben az ivóvízbe is bekerül. Másik neve a tüsszőhormon, mivel a fő termelődési helye a petetüssző falát alkotó granulosa sejtek. Emellett termelődik még testszerte egyéb helyeken is, a májban, mellékvesében, zsírszövetben, illetve vemhesség során a placentában. Az E2, illetve az ösztrogén-szerű vegyületek intracellularis ösztrogénreceptorokhoz kapcsolódva, órák-napok alatt alakítják ki hatásukat. Ezek, a klasszikus úton ható receptorok, az ún. klasszikus ösztrogénreceptorok, az ER α (elsőnek írták le, 1973-ban) és ER β (1996). Az endokrin diszruptorok (ED), ezen belül a kámfor képes e receptorokhoz kötve antagonizálni az ösztradiol hatását. Ezen receptorok többek között kimutathatóak a neuronokon és gliasejteken is [1]. Emellett létezik egy rapid, nem genomiális út is, mely sokkal gyorsabb és nem intracellularis, hanem egy Gprotein kapcsolt 7-transzmembrán receptor közvetíti, a GPR30 [2] [3] [4].

Ösztrogén kisebb mértékben ugyan, de termelődik a hím egyedekben is. Legnagyobb mértékben a reprodukív szervekben. Az ösztrogént átalakító enzim, az aromatáz, mely a CYP450 (citokróM P450) enzimrendszer részeként az endoplazmatikus retikulumban van, a hím egyedekben szintén számos szervben megtalálható, így az agyban, herékben, bőrben, érfalban is. Azok a felnőtt férfiak, akiknek az ösztrogénreceptor vagy az aromatáz enzim génei hibásan fejlődnek, esetleg gátoltak működésükben, gyakran érintettek csontrendszeri betegségeKben. Ezeket ösztrogénterápiával jól lehet kezelni.

Az ösztrogének bioszintézisének alapja a koleszterin. A koleszterint az egyes szervekben enzimek alakítják át, így a végmolekula a szervben megtalálható enzim függvényében más és más lehet. A női nemi hormonok szintézise a koleszterin pregnenolonná alakulásával folytatódik. Abból progeszteron, 17-alfa hidroxiprogeszteron, androsztendion, majd aromatáz enzimmal ösztron, ösztradiol, végül ösztriol keletkezik. Az ösztetrol csupán a vemhesség során keletkezik, az embrió májában, ösztradiolból, illetve ösztriolból, hidroxiláz enzim hatására. Ennek a termelése posztnatálisan leáll, mert az enzim kiürül a szervezetből.

A hormonok főként az ovarium granulosa sejtjeiben termelődnek, mivel itt lokalizálódik az aromatáz enzim. Míg az ovarium theca sejtjeinek felületén elsősorban luteinizáló hormon (LH) receptorokat találhatunk, addig a granulosa sejtek follikulusztimuláló hormon (FSH) receptorokat expresszálnak, így az FSH kifejtheti hatását, ami a tüszőérés stimulálása, ezzel együtt pedig az ösztrogéntermelés. Az ovarium mellett a szervezetben számos más szövet rendelkezik aromatáz aktivitással, így például a Sertolli-sejtek a herében, a zsírszövet, de jelen van az enzim a központi idegrendszerben, emlőben, sőt a csontokban is. Ebből következik, hogy ezekben a szövetekben is keletkezik ösztrogén (elsősorban ösztron). Így lehetséges az, hogy a hímekben, illetve az ovariectomizált nőstényekben is képződik ösztrogén.

Az ösztrogén másik formája az ösztron, mely a szervezetben legkisebb mértékben van jelen. Az ösztriol is kis mértékben jelen van a szervezetben, és sajátos a preferenciája az ER β receptorokhoz. Különlegessége, hogy enyhe a hatása, illetve, hogy ösztradiollal a GPR30 receptoron ösztrogén-antagonista tulajdonságú. Az ösztrogénhez hasonló hatású ösztetrol az anyai szérumban található meg, kb a vemhesség 20. napja környékén [5].

Pajzsmirigyhormonok

A pajzsmirigy a légcsövön található, iztmusszal összekötött 2 lebenyből álló mirigyes endokrin szerv. Hormonjai, a tiroxin (T₄) és a trijód-tironin (T₃), a szerv follikuluszában kolloidot alkotó tireoglobulin fehérje felszínén képződnek, az azon található tirozin láncok jód-kötése révén. Az endokrin diszruptorok jellegzetessége, hogy gyakran a hormonhatást már a hormon kialakulásánál gátolják. A kámfor a pajzsmirigy hormonokat egyelőre ismeretlen hatásmechanizmussal gátolja, így lehetséges, hogy már a bioszintézisük során hat rájuk. A follikuluszba aktív pumpamechanizmussal (ami egy, nátrium-jód pumpát és egy pendrinpumpát foglal magába) beérkező jód ionok peroxidáz enzim segítségével elemi jóddá alakulnak, mely utat a kámfor vélhetően nem gátol le, [6] majd a tireoglobulin molekula felszínén, annak tirozin végéhez csatlakoznak, így lesz belőlük monojód-tirozin (MIT), két jód beépülésével dijód-tirozin (DIT). E két molekula különböző kombinációjú összekapcsolódása, T₃-má és T₄-gyé alakulása után a hormon leadása következik, mely első lépéseként a follikulust bélelő hámsejtbe lép endocitosisal. A hormon a tireoglobulin LRP2 (low-density lipoprotein receptor-related protein 2) receptoraihoz való kötődése után a tireoglobulin lebomlik, és legnagyobb részt a T₃ és T₄ kerülnek passzívan a keringésbe. A

jód, illetve a visszamaradt tireoglobulin visszakérülnek a follikulusba, ahol újrafelhasználódhatnak. Dejodináz enzimek segítségével történő összeépülésükkel trijód-tironin (MIT+DIT) vagy tetrajód-tironin (DIT+DIT) keletkezik. Mindez a folyamat (hormon sejtől való passzív kilépésén kívül) a hipotalamusz pajzsmirigy serkentő hormonja (TSH) által – negatív visszacsatoláson alapuló – serkentett folyamat. A kámfor nem a feedback mechanizmus legátlója, inkább a hormonok szintézisét teszi tönkre [6]. A hormonszintézist valamilyen úton gátló anyagok, tiocianátok (peroxidáz-gátló), szulfocianátok (jódtranszport gátló), illetve az endémiás jódhiány szintén pajzsmirigy-alulműködést eredményeznek. A pajzsmirigyben a MIT és DIT összekapcsolódásán kívül még az I.-es típusú dejodináz révén is keletkezhet T4-ből sokkal aktívabb T3. Ezen enzim bizonyos génjeit számos diszruptor, többek között a kámfor is képes gátolni, tehát a kámfor részt vehet az aktív pajzsmirigyhormonok kialakulásához szükséges enzim legátolásában [7]. Ez az enzim szelén-ciszteint tartalmaz, így a szelénhiány is pajzsmirigy-alulműködéshez vezethet. Emellett pajzsmirigy-alulműködést okozhat még többek között a túl sok jód felvétele, lítium szervezetbe jutása, vagy akár a Brassica-félék, pl. a fejes káposzta (*Brassica oleracea convar. capitata var. alba*), karfiol (*Brassica oleracea convar. botrytis var. botrytis*), kelbimbó (*Brassica oleracea convar. oleracea var. gemmifera*) felvétele. A pajzsmirigy 90%-ban T4-et, 10%-ban T3-at választ ki.

Ezután a hormonokat a szervek igénye szerint, a szervezet különböző pontjaira szállíthatják az albumin, TBG (Thyroxine-binding globulin), TBPA (thyroxine-binding prealbumin) molekulák, majd dejodináz enzimek segítségével módosulnak a célszervnél. A módosítás a dejodináz enzimektől függően eredményezhet tiroxint (3,5,3',5'-tetrajód-tironin), trijód-tironint (3,5,3'-trijód-tironin), vagy reverz trijód-tironint (3,3',5'-trijód-tironin). Amennyiben a dejodináz enzimek működése akár öröklötten zavart szenved, vagy endokrin diszruptorok legátolják, a következmény pajzsmirigy-alulműködés lesz.

Az aktív pajzsmirigyhormon (T3) a hőháztartás szabályozásával, a szívfrekvenciát növelve, szívre pozitív inotróp hatásával és számos egyéb szerepével az anyagcsere fokozásáért felelős hormon. A fejlődést, csontok növekedését serkenti, kételtűekben a metamorfózist fokozza, a szénhidrát-, lipid-, fehérjemetabolizmust is felgyorsítja, növeli a vércukorszintet és az alapanyagcserét [5].

Ösztrogén, tiroxin hatása a központi idegrendszerre:

Ösztrogén hatása a kisagyra

Kísérletünk modelljének használtuk a kisagyat, segítségével az ösztrogén kisagyi sejtekre kifejtett hatásának analógiájára átfogó képet kaphatunk a hormon központi idegrendszerre kifejtett hatásáról is. Már tudjuk, hogy ösztrogénreceptorok expresszálódnak a kisagyi sejteken, és semi-quantitatív PCR vizsgálatokkal azt is kimutatták, hogy pontosan milyen tendenciával változik az egyes ER altípusok expressziója a születés utáni élet első 15 napjában. Ezen vizsgálatokból kiderül, hogy az élet első 4 napján a reprodukciósért legfőképp felelős ER α expressziója a legalacsonyabb, majd a 4-től a 10. napig folyamatosan nő, végül a 15 napig csökkent tendenciát mutat. Az ER β -t szubtípusaira bontva, az ER β 1 az első 4 napon volt a legmagasabb, majd az ER β 2 dominált. Az ER β receptorok – melyek a nem reprodukciós folyamatokért felelnek és a kisagy mellett még más agyi területeken is kifejeződnek – komplementer módon expresszálódtak az ER α receptorokkal, tehát az első 4 napban ezek kifejeződése a domináns, majd a 10. napig csökken, végül újra nő. A vizsgálat kiterjedt nemcsak a receptorfehérjékre, de természetesen azok mRNS szintjeinek vizsgálatára is, mely alátámasztotta a receptorfehérje-szintek változásait. BERKO (ER β mentes „knock-out” egerek) egerek agyában számos morfológiai abnormalitás alakul ki, és az Alzheimer- és Parkinson-kórral is összefüggésbe hozták e receptorok hiányát, így amennyiben valamilyen oktanú ER β receptor hiány, hiba, vagy antagonizmus alakul ki, fennáll a veszélye ezen kórképeknek [8] [9] [10]. A kisagyi ER β receptor expressziók függenek a kortól és a sejtípustól, ám az állat nemétől nem [11]. A posztnatális élet során, a Purkinje-sejteken, kosársejteken, asztrocitákon és a Golgi-sejteken nagymértékű a receptor fehérjék és receptorfehérje mRNS-ének jelenléte. A kisagy fejlődése során a fejlődő neuritokon, illetve a vándorló gliasejteken a legnagyobb az ER β expresszió [11] [12]. Ezen észrevételek voltak az anatómiai bizonyítékai annak, hogy az ösztrogénreceptorok megjelennek a cerebelláris sejteken a születés utáni élet elejétől kezdve egészen a felnőttkorig, így célpontjaivá válnak az ösztrogénhatásnak, ezzel együtt az ösztrogénhatás kiesése is hatással van rájuk. Az E2 receptorokat összefüggésbe hozták továbbá, az agyi motoros funkciók fejlődésével, a kisagyi plaszticitás és sejtkapcsolatok elősegítése révén [13].

Pajzsmirigyhormon hatása a kisagyra

A fejlődő emlős agya egyaránt érzékeny a túl alacsony és a túl magas pajzsmirigyhormonszintekre. A kritikus időszakban, a fejlődés korai szakaszában alacsonyan maradó tiroid hormon szint (TH) vezethet egyaránt a mielinhüvely fejlődésének elmaradásához, és a sejtmigráció hiányához. Ezen események defektusa a későbbi életben viselkedésbeli és teljesítménybeli visszamaradottsághoz vezethetnek. A hormon képes aminosav transzporterekkel átjutni a vér-agy gáton, így bejutva a központi idegrendszerbe. Az aktív pajzsmirigyhormon, a T3, a T4-ből alakul ki, a kettes típusú dejodináz enzim (D2) hatására, mely a tanicitákban (központi idegrendszerben található sejt típus, mely a centrális idegrendszer és az agyalapi portális keringés között képez hidat), gliasejtekben és asztrocitákban is megtalálható. A neuronokban levő TR magreceptorok, a hormon bekötése után különböző fehérjék, mitokondrium, mielin, neurotrofinok, transzkripciós faktorok, stb expressziójához vezetnek. A TR α 1 receptor izotípus *in vivo* egérben képes az oligodendroglia sejtek differenciációját két fázisban serkenteni: először az embrionális élet kezdeti szakaszán, amikor megfelelő környezetet biztosítva segíti ezen sejtek fennmaradását, különböző neurotrofikus faktorok termelésének segítségével, majd az axonok növekedése után egy hétig az oligodendroglia sejtek proliferációját segíti [14]. A TR α 1 receptornak szerepe van mind a fejlődő, mind a kifejlett agy működése során, a felnőttkori neurogenesisben, a kortikális neuronok migrációjában, a GABAerg sejtek fejlődésében is. Az élet során legelőször a telencephalon sejtjein jelennek meg e receptorok, majd a fejlődő Purkinje-sejtekben is megjelennek, ám a kifejletteken már nincsenek, illetve a kisagyi sejteken eleinte nincsenek, ám a sejtmigráció során megjelennek [15]. TR α 1 mutációk elsősorban a Purkinje- és a Bergmann-gliasejtek differenciálódását károsítják, tehát annak ellenére, hogy sok célsejtje van a receptornak, mégis vannak preferáltak [16]. A pajzsmirigyhormon tehát több ponton szabályozza a központi idegrendszer sejtjeinek működését, ezen funkciók kiesése, legátlása pedig súlyos kórképek kialakulásához vezethet.

Ösztrogén és pajzsmirigyhormonok egyensúlya

Kérdés, hogy e két hormon és receptorai ugyanannyira fontosak-e, illetve kommunikálnak egymással. Több tanulmány is bebizonyította, hogy ezek szinergista módon működnek, tehát kommunikálnak egymással, mind sejtmagi, mind molekuláris szinten, gondoljunk csak az éhség-jóllakottság érzetekben szerepet játszó hormonokra, leptinre, grelinre, inzulinra, ösztrogénre, pajzsmirigyhormonokra. Az élőlényeknek egyaránt szükségük van E2-re és

TH-ra is, ezek nemcsak egymás hatását változtatják, de a receptoraik expresszációja is a hormonok kombinációjától függenek. Emellett a szöveti integritás károsodása is alakítja a receptorok expresszióját [17] [18] [19] [20].

A fent bemutatott ösztrogén és pajzsmirigyhormonok mindegyike nagyon fontos szerepet játszik a kisagy fejlődésében, kialakulásában, már egészen a fejlődés korai szakaszától kezdve. Mindezt alátámasztja, hogy ösztrogénreceptorok a kisagy fejlődésének egészen korai pontján kialakulnak a szerv sejtjein. Pajzsmirigyhormonok szintén, már a fejlődő cerebellumon kifejtik hatásukat. Rendelkezésre álló adataink szerint az E2 és a pajzsmirigyhormonok egyformán fontosak a cerebellum fejlődéséhez. Habár az ösztrogén és pajzsmirigyhormonok szerepe a fejlődésben jól ismert, a rajtuk kialakuló gátló hatások, esetleg a szintézisük során bekövetkező antagonizálások még nincsenek pontosan leírva. Nem igazán ismerjük az e hormonokat befolyásoló endokrin diszruptorokat, sem pontos hatásukat, hatásmechanizmusukat, sem a cerebelláris, sem egyéb sejteken.

Endokrin diszruptorok, fitoösztrogének:

Az endokrin diszruptorok (ED) olyan kémikáliák, melyek dóziszfüggően, valamilyen módon befolyásolják az endokrin rendszert, és lévén az endokrin rendszer a szervezet egyik fő irányítója, így az egész szervezet működésére és fejlődésére hatással vannak. Léteznek olyan endokrin diszruptor vegyületek, melyek képesek az ösztrogénreceptorokhoz kötni, és befolyásolni azok működését. Habár ösztrogénszerű hatásuk lehet, de sosem lesznek annyira effektívek, mint az ösztradiol (E2). Ezek az anyagok lehetnek olyan környezeti szennyező anyagok, pl fito-, mikoösztrogének, melyek megtalálhatóak a természetben és felboríthatják az endokrin rendszer működését. A leggyakoribb mikoösztrogének a Fusarium gombák termékei [21] [22]. A fitoösztrogéneknek 2 nagy csoportja a lignánok, és az izoflavonoidok.

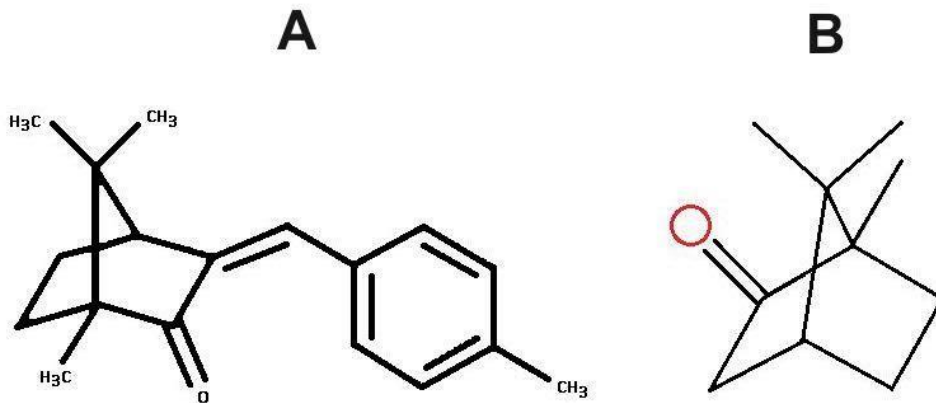
Az endokrin diszruptorok lehetnek szintetikus anyagok is, pl. az először 1938-ban szintetizált nem szteroid ösztrogén, a dietilstilbösztrol. (DES) Ezt az anyagot sokáig alkalmazták vaginitisz, posztpartum laktáció, menopauza tüneteire, illetve a szülési komplikációk csökkentésére terhes nőknek. Férfiaknak is adták, mert ez volt az első hatásosnak bizonyuló szer a metasztatikus prosztatata daganat ellen. Csupán 1971-ben derült ki, hogy bizonyítható tényező bizonyos hámsejt eredetű daganat kialakulásában. Az ED-k hatásukat azért tudják kifejteni, mert vagy képesek kötődni a receptorokhoz, így

megakadályozva az eredeti hormon bekötését, vagy be tudnak kötni a receptorhoz, de nem akadályozzák az eredeti hormon hatását, hanem azzal agonistaként a hormon hatásának többszörösét képesek a szervezetre mérni. Ezeken kívül ezek az anyagok képesek lehetnek még beleszólni az eredeti hormon metabolizmusába, például a májbeli lebontást akadályozhatják. Az érintett hormonok és hormonreceptorok elsősorban az ösztrogén- és a pajzsmirigyhormonok, illetve azok receptorai.

Mindennapjaink során folyamatosan ki vagyunk téve különböző endokrin diszruptorok hatásának, mind mi, emberek, de az állatok is. A vegyületek a károsító hatásukat sokkal erőteljesebben ki tudják fejteni, ha a szervezet a pre-, és korai posztnatális élet során érintkezik velük, ugyanis a fejlődő szervezet sokkal érzékenyebb, sérülékenyebb, kevésbé tud hatékonyan védekezni az ED-k hatásai ellen. Tanulmányunk, illetve a legtöbb tanulmány ilyen témában egy bizonyos diszruptor hatását írja le, habár az életben egyszerre több ilyen anyaggal is érintkezünk. Ezen anyagok kombinációinak hatását még nem ismerjük.

Kámfor

A kámfor (1. ábra) egy jól ismert ösztrogénhatású toxikus anyag, világszerte elterjedt endokrin diszruptor, évente több ezer mérgezés kiváltó oka. Ez azért lehetséges, mert széles körben megtalálható, hiszen a mindennapi élet számos területén ki vagyunk téve ennek az anyagnak, gondoljunk csak a kozmetikai termékekre, ahol a termékek illatanyagának létrehozásáért, lipofil tulajdonságáért használják, de alkalmazzák még számos helyen, a fertőtlenítőszerektől kezdve a napvédő krémek UV védelmét biztosító kámfor adalékain keresztül a vallásos ceremóniákig, de még az élelmiszerekben is. A kámfor-toxikózis percekben belül, legkésőbb 24-48 óra leforgása alatt, akut módon alakul ki, manifesztációja pedig neurológiai, gasztrointesztinális, légzőszervi, szív- és érrendszeri tünetekben nyilvánul meg. A *per os* felvett kámfor letális dózisa felnőttek körében 50-500 mg/kg, gyerekeknél ez 70 mg/kg. 50 mg/kg felett neurológiai tünetek jelentkezhetnek. Legsúlyosabb esetben akár agyvérzést, kómát, légzési apnoét is okozhat. A legtöbb látható tünet akut módon jelentkezik ugyan, de az elváltozások irreverzibilisek [23] [24].



1. ábra: Kámfor vegyületek molekuláris szerkezete. Az ábra A részén a 4-metilbenzilidén molekuláris szerkezete, a B részén a természetes kámfor molekuláris szerkezete látható.

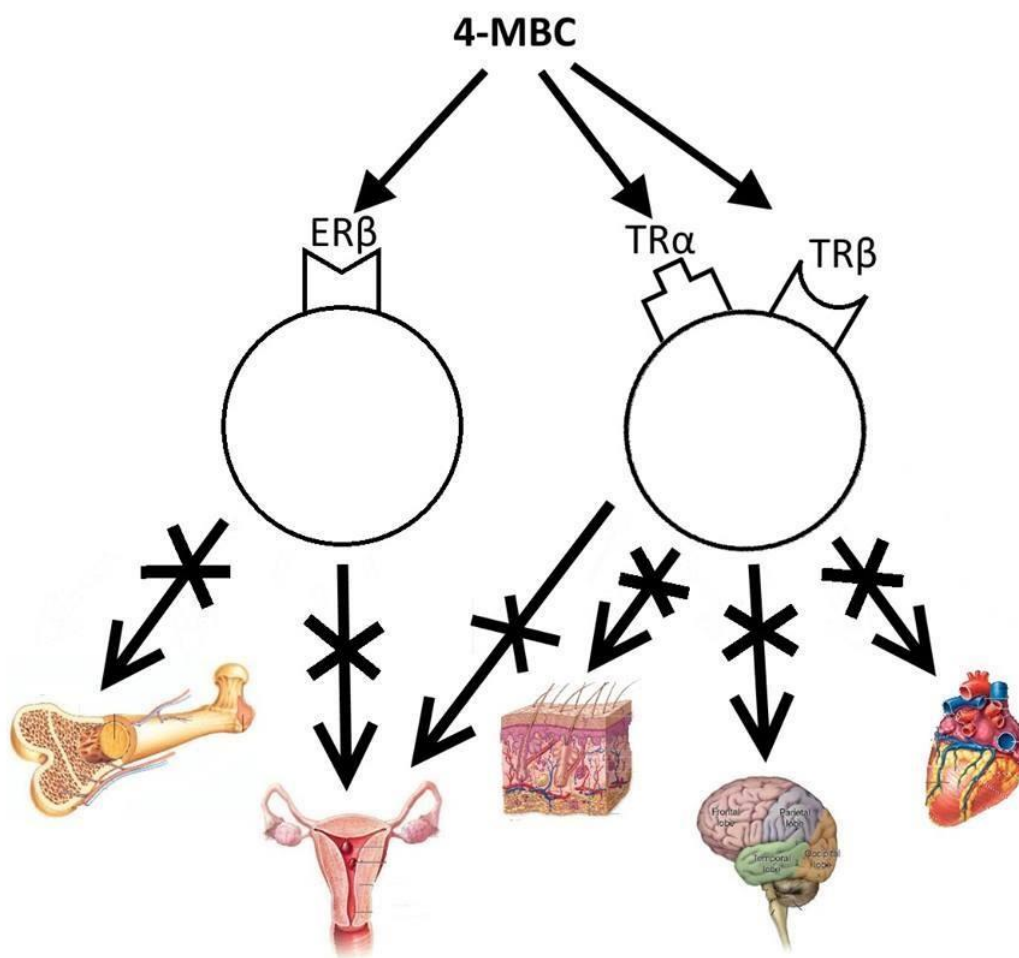
A kámfor a természetben megtalálható növényi olaj, egy rendkívül lipofil ciklikus terpén. Fellelhető a közönséges kámforfa (*Cinammomum camphora*) kérgében, illetve nagyon sok növényi aroma is kámfor eredetű, mint például zsálya (*Salvia fruticosa*, *Salvia lavandulifolia*), cipruska növény (*Santolina insularis*), üröm (*Artemisia annua*) aroma anyagai. A fentiek mellett a kámfor szintetizálható terpentintől.

A kámfor felhasználása egészen az Ókori Kínáig nyúlik vissza, Európában a középkortól kezdve használják egyre szélesedő körben. Jelenleg alkalmazzák köhögéscsillapítók hatóanyagaként, inhalátorokban, antimikrobiális, antivirális szerekben, illetve fájdalomcsillapítókban, és inszekticidekben is. Fontos róla tudni, hogy fizikai tulajdonságai, az oldhatósága lehetővé teszi, hogy a bőrfelületen könnyen penetráljon, így sokszor krémekben is felhasználják, mint segédanyagot [25]. Ez a hatása azonban bizonyos testidegen anyagok szervezetbe jutását is megkönnyítheti, ám a bőrrel a szisztémás keringésbe csak lassan jut el. Amennyiben bejut, széles körben elterjed a szervezetben belül, a vesékben, agyban, májban, a magzatban, még az amnion folyadékban is.

A kámfor toxikus tulajdonságait a XIX. században ismerték fel, majd 1983-ban, az FDA (Food and Drug Administration) 11%-ra limitálta a kámfor előfordulásának maximumát az egyes termékekben. Ezen szabályozás ellenére is, a tiszta kámfor tabletták (camphor cube) és egyéb kámfor tartalmú termékek, amelyeket Kína és India importálnak, nagyrészt 20 százaléknál is tartalmazhatnak a tiltott anyagból. Ezek a termékek javarészt illegálisan árult cikkek a fekete piacon, megfázásra, bőrápolási terméként, fejfájásra, hasfájásra, terhesség

során, az aranyér enyhítésére külsőleg alkalmazandó krémekben, érösszehúzó, hűsítő, viszketést csökkentő hatása miatt, de felhasználják akár még spirituális rituálék segédleteként is. Ez vezetett ahhoz, hogy ilyen mértékben elterjedt a kámfor toxikózis a világban, számszerűsítve pedig: csak az USA-ban, 2011-ben az American Association of Poison Control Centers Toxic Exposures Surveillance System által rögzített adatok alapján több, mint 10,000 kámfortoxikózisos esetet regisztráltak.

A kámfor toxikus hatásmechanizmusa egyelőre nem teljesen ismert. A kámfornak természetesen többféle formája van a természetben, illetve eltérő szerkezetű vegyületei használatosak az iparban, ennek megfelelően a különböző izomerek más dózisban, más szervezetben, más hatásokat produkálhatnak. Például az UV szűrőként használatos 3benzilidén kámfor (3MBC) a halakban és emlősökön ösztrogénszerű hatással bír, míg a 4metilbenzilidén (4MBC) kámfor főleg patkányokban köt az ösztrogénreceptorokhoz. Ezen felül a 3MBC speciális hatása, hogy míg a vemhes állat súlyát csökkenti, úgy a születés utáni túlélési rátát, illetve a csecsemőmirigy súlyát növeli. Másrészt a reprodukív szervek méretét, súlyát hímekben és nőstényekben egyaránt befolyásolja [26]. Egyes tanulmányok szerint a kámfor nem kompetitív nikotinos acetilkolin-receptor antagonist, így csökkenti a katekolamin szekréciót [27]. A kámfor nem kompetitív inhibitora az acetilkolin-észteráznak is [28]. Emellett képes bekötni bizonyos ösztrogénreceptorokhoz, illetve gátolni tudja a pajzsmirigyhormonok bioszintézisét is, így számos szervrendszeren ki tudja fejteni módosító hatását (2. ábra). Lipofil tulajdonságának köszönhetően könnyen penetrál a hámszöveten, illetve membránokon keresztül. Abszorpciója a gasztrointesztinális traktuson keresztül, bőrön át, inhalációs úton, és a nyálkahártyákon keresztül is megtörténhet. Abszorpció után oxidálódik és konjugálódik a májban, majd a vesével és kis mennyiségben a tüdőn keresztül választódik ki. *Per os* úton bejuttatott kámfor, magas koncentrációt érhet el a magzati agyban, májban, vesében, és vérben, illetve az amnionfolyadékban. Mivel a magzatokban hiányzik a hidroxilációhoz és a glükuronsavas konjugációhoz szükséges enzimrendszer, gyakori a spontán vetélés a kumuláció miatt, ám teratogén hatása nem ismert. A halál oka általában légzőrendszeri összeomlás.



2. ábra: A kámfor szervezatkárosító hatása. A MBC ERβ, TRα és TRβ receptorokra kifejtett gátló hatása révén elsősorban az ábrázolt szervek működését zavarja meg.

Látva a kámfor toxikózis előfordulásának gyakoriságát, és a mérge pusztító hatását, fontos az ilyen irányú kutatások végzése, támogatása, hogy megértsük a ma még ismeretlennek tekinthető hatásmechanizmusát. Felismerve a tüneteit, a toxikózis által érintett szerveken történő hosszú távú hatását, a szakemberek specifikus antidótumot fejleszthetnének ki ellene, ám egyelőre csupán támogató, nem specifikus terápiát ismerünk a kámformérgezés kezelésére [29] [30].

Primer kisagyi sejtutúra

Kísérleteink során *in vivo* szérum-, antioxidáns- és szteroidmentes primer kisagyi sejtutúrát alkalmaztunk. Az alkalmazott sejtutúrában a cerebelláris sejtek egy rétegben

helyeződnek el, illetve egymással nem érintkeznek, így az adott sejtet érő külső hatások nem terjedhetnek át a környező sejtekre a parakrin kommunikáció segítségével. Így a kísérlet végén a sejt kultúrában vizsgált sejtek mind az endokrin diszruptor moduláló hatására szolgáltak bizonyítékként, nem pedig a sejtek közti kapcsolat szorosságára. Az *in vivo* kísérleti modellre azért volt szükségünk, mert csak az élő sejtek tudnak reagálni a környezetükben beálló változásra, jelen esetben receptoraik expressziós szintjének modulálásával. A szérums-, antioxidáns- és szteroidmentességre azért volt szükség, mert ezek az anyagok befolyásolhatják az agyban található sejteket, így torzíthatják a kísérlet végeredményét [31].

Célkitűzések

A kámfor, mint ismert endokrin diszruptor hatású vegyület, a szervezetbe jutva képes felborítani a neuroendokrin szabályozási mechanizmusokat, és ezzel befolyásolni a kifejlett emlősök hormonháztartását, illetve tönkretetheti az egyedfejlődés kényes mechanizmusainak egyensúlyát is.

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

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

Anyag és módszer

Állatok

Korábbi eredményeink alapján az állatok neme nem befolyásolta a kísérleteink eredményét, így egyaránt használtunk hím és nőstény Sprague-Dawley patkány kölyköket (átlagos testtömeg: 18-20g). A tenyésztőtől vásárolt vemhes nőstények (TOXI-COOP Zrt, Budapest, Magyarország) az ellés előtt minimum 4 nappal lettek az állatházunkban elhelyezve.

Innentől az állatokat megfelelő laboratóriumi körülmények között tartottuk, *ad libitum* táp és ivóvíz mellett egy 12 órás nappal, 12 órás sötét ciklusban. A kölykök születését posztnatális nulladik napként (P0) jelöltük. A sejt kultúrát alkotó sejtek izolálása a hetedik posztnatális napon (P7) történt meg. Az állatok használatát a Szent István Egyetem Állatjóléti tanácsa, és a regionális Állategészségügyi és Állatvédelmi Igazgatóság engedélyezte (regisztrációs szám: XIV-I-001/2201-4/2012) [32].

A sejt kultúra létrehozása

A primer kisagyi szemcsesejt-kultúrát a már publikált metodika alapján állítottuk elő. Az állatok kisagyát gyors dekapitálást követően eltávolítottuk. Az agyszövetből izolált sejteket enzimátikus kezelés nélkül szérum- és szteroidmentes környezetben inkubáltuk. A 7 napos inkubálási idő letelte és a kezelések megtörténte után a sejteket EDTA-s PBS oldat segítségével, mechanikai úton betakarítottuk. A sejt kultúra gliatartalmának ellenőrzése GFP (Glial Fibrillary Acidic Protein) segítségével történt. A kiültetés részletes metodikája, a sejt kultúrák glia tartalmának ellenőrzése és a sejtek tipizálása egy korábbi publikációnkban olvasható [33] [17].

Kezelések

A gliamentes sejt kultúrák előállításához 10 μ M cytosine β -D-arabinofuranoside-ot (AraC; Sigma Aldrich Ltd., Magyarország) használtunk mintánként 24 órával a kiültetést követően. Az AraC képes legátolni a nem neuronális eredetű sejtek osztódását (AraC + kísérleti csoport). A gliát tartalmazó csoportok médiumába nem került AraC (AraC – kísérleti csoport). A sejt kultúrákat a kiültetést követő hetedik napon (P14) az alábbi endokrin diszruptorokkal és/vagy hormonokkal kezeltük (fiziológiásan előforduló koncentráció, ill. a környezeti szennyezés után mérhető koncentráció). 17 β -estradiol (E2, 1.16x10⁻¹⁰ M, Sigma

Aldrich Ltd., Magyarország, vízdékony); 3,3',5-triiodo-L-thyronine (T3, 0.92 nM, Sigma Aldrich Ltd., Magyarország); L-thyroxine (T4, 65 nM, Sigma Aldrich Ltd., Magyarország); 4-methyl benzilidene camphor (MBC, 6.3×10^{-8} M, Sigma Aldrich Ltd., Magyarország).

Western blot technika

A sejtek betakarítását követően a mintákhoz, a gyártó protokollját követve lízis puffert (MPER Mammalian Protein Extraction Reagent, Thermo Scientific) és proteáz inhibitorot adtunk (HALT Protease and Phosphatase Inhibitor Coctail, Thermo Scientific), majd 5x5 másodperces ultrahangos homogenizálás után a mintáink fehérjekoncentrációját egy bicinchoninsav fehérje próba (BCA; bicinchoninic acid protein assay kit; Thermo Scientific) segítségével mértük meg. A Western blot analízis során a mintákat 10%-os poliakrilamid gélben (Precise Tris-Glycine Gel, Thermo Scientific) futtattuk. A fehérjéket molekulásúly szerinti választottuk szét, majd megtörtént a transzfer, melynek során egy PVDF (Immobilon-P, Millipore) membránra vándoroltattuk. A membrán még megmaradt szabad kötőhelyeit 5%-os, zsírmentes tejjel blokkoltuk egy órán keresztül, majd az általunk vizsgált receptor proteineket TBS-T (Tris-Buffered Saline with Tween) oldatban, a megfelelő ellenanyagok (Primer ellenanyagok: Anti-estrogen receptor beta, Sigma Aldrich, E-1276, hígítás: 1:1000; Anti-thyroid hormone receptor alpha, Abnova, PAB11276, hígítás: 1:1000; Anti-thyroid hormone receptor beta, Abnova, PAB11277, hígítás: 1:1000.

Szekunder ellenanyagok: Peroxidase labeled goat anti-rabbit IgG, Vector Laboratories, PI-1000, hígítás: 1:2000; Peroxidase labeled horse anti-mouse IgG, Vector Laboratories, PI2000, hígítás: 1:2000) segítségével jelöltük meg. A megjelölt fehérjesávokat röntgenfilmen tettük láthatóvá, kemilumineszcencia (Western Lightning Chemiluminescence C.N., PerkinElmer) segítségével, majd a kapott jeleket denzitometriásan analizáltuk. Az egyes csoportokból készült legalább 3 mérés eredményét átlagolva kaptuk meg az eredményeinket. Az optikai denzitásértékeket a nem kezelt kontroll mintából mért értékekhez viszonyítottuk.

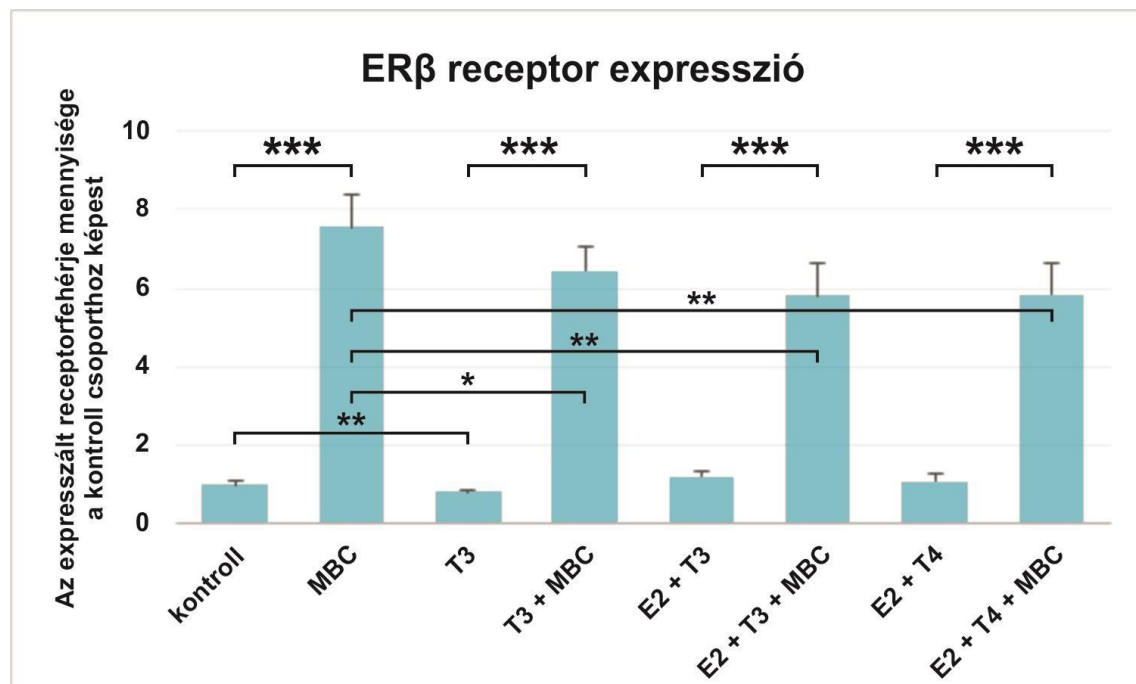
Adatelemzés

A statisztikai analízisként használt egyutas ANOVA-t Tukey-féle teszttel kiegészítve a ÁTE Biomatematikai tanszék segítségével végeztük el. Az adatok elemzését az EXCEL (Microsoft, Microsoft Co., Redmond, WA, USA) és a GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, San Diego, CA) program segítségével elemeztük ki.

Eredmények:

Western-blot módszerrel vizsgáltuk az ER β , TR α , TR β receptorok expressziójának változását a primer kisagyi sejt kultúra sejtjein, 4-metilbenzilidén-kámfor (MBC) hiányában, majd jelenlétében, illetve E2, T3 és T4 különböző kombinációjú előfordulásakor.

ER β receptorok expressziójának változása kezelések hatására

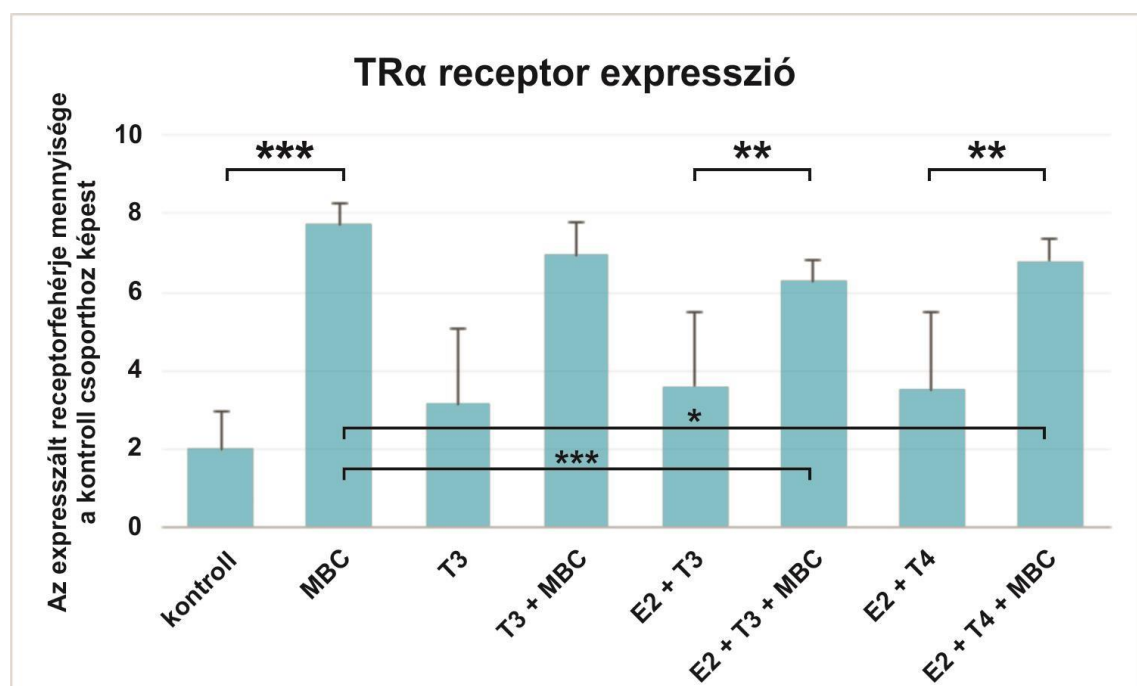


3. ábra: az ER β receptorfehérjék expressziója, hormon és kámfor kezelés hatására. Az ER β receptorfehérjék expresszióját az oszlopok magassága jelöli, kezeletlen, majd MBC kezelt, T3; T3 és MBC kezelt, E2 és T3; E2, T3 és MBC kezelt, E2 és T4; E2, T4 és MBC kezelt sejt populációkon. Az y tengelyen ábrázolt értékek a mért fehérje expressziójának mértékét mutatják a kontroll csoport expressziójához képest. Az oszlopok felett jelzett csillagok a jelölt oszlopok közti szignifikáns különbséget mutatják (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001).

Az ER β receptorok expressziója (3. ábra) a kontroll csoporton ($1 \pm 0,08$) mérve átlagosan 656,58%-kal volt alacsonyabb, mint MBC-vel kezelt sejtek populációján ($7,56 \pm 0,81$). A változás mértéke szignifikáns volt. A mért adatokból arra következtettünk, hogy a kontrollcsoport sejtjei érzékelik a környezetükben beálló változásokat, és arra a receptoraik expressziójának fokozásával válaszolnak. Ugyanezen receptorok expressziós szintjét T3 hormon kezelés ($0,81 \pm 0,03$), és T3 + MBC kezelés ($6,45 \pm 0,6$) után is megvizsgáltuk. A receptor expressziós szintje 564,19%-kal volt kevesebb, amennyiben csupán T3 hormon

kezelést kaptak a sejtek. Kámfor és T3 kezelés hatására a receptor fehérjék kifejeződése szignifikáns növekedést mutatott, mind a T3-mal kezelt, mind az ntc és az MBC sejtpopulációkhoz viszonyítva. A T3-mal kezelt sejtek 18,75%-kal kevesebb ösztrogénreceptor fehérjét fejeztek ki, mint az ntc populációk. Megvizsgálva a sejtpopulációt T3 és E2 kezelés ($1,18 \pm 0,15$) után, illetve T3, E2 és MBC hozzáadását ($5,81 \pm 0,85$) követően azt az eredményt kaptuk, hogy a kámfor kezelés hatására 462,89%-kal megnövekedik az ER β expresszió. Emellett 37,25%-kal mértünk nagyobb ER β expressziót az E2-vel is kezelt sejteken, mint a csupán T3-mal kezeltéken. A T4-gyel, illetve E2-vel kezelt populációk ($1,07 \pm 0,22$), MBC-s kezelés nélkül 477,71%-kal kevesebb ER β -t expresszáltak, mint a kámforos kezelés után ($5,84 \pm 0,79$). Az E2 illetve T3 kezelt sejtpopulációk 11,75%-kal több ER β -t expresszáltak, mint az E2 és T4 kezelték.

TR α receptorok expressziójának változása kezelések hatására

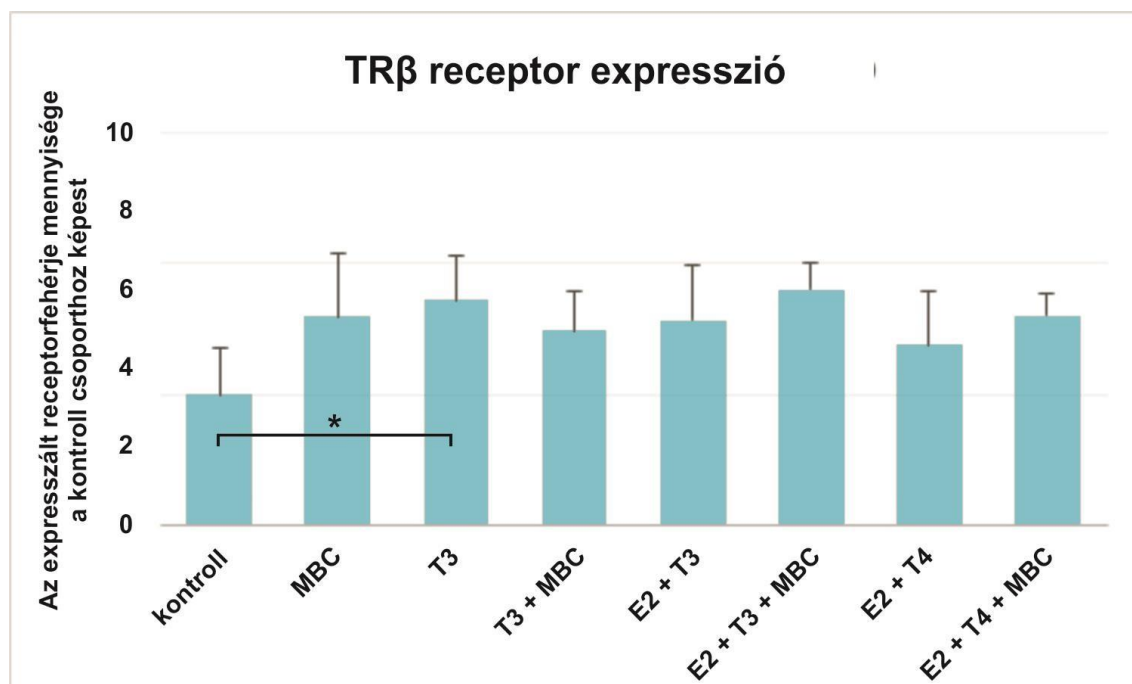


4. ábra: a TR α receptorfehérjék expressziója, hormon és kámfor kezelés hatására. A TR α receptorfehérjék expresszióját az oszlopok magassága jelöli, kezeletlen, majd MBC kezelt, T3; T3 és MBC kezelt, E2 és T3; E2, T3 és MBC kezelt, E2 és T4; E2, T4 és MBC kezelt sejtpopulációkon. Az y tengelyen ábrázolt értékek a mért fehérje expressziójának mértékét mutatják a kontroll csoport expressziójához képest. Az oszlopok felett jelzett csillagok a jelölt oszlopok közti szignifikáns különbséget mutatják (* p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001).

A kontroll csoportban ($1 \pm 0,49$) 286,46%-kal mértünk szignifikánsan kisebb TR α expressziót, (4. ábra) mint az MBC kezelt csoportban ($3,86 \pm 0,27$). A csupán T3-mal kezelt

csoporthoz (1,57 ± 0,98) 190,77%-kal fejezett ki receptorfehérjét a T3 mellett MBC-vel is kezelt sejtpopulációnál (3,48 ± 0,42). A T3-mal kezelt csoportban 57,25%-kal mértünk fokozottabb TR α receptor expressziót, mint az ntc csoportokban. Az E2-vel, T3-mal és MBC-vel kezelt sejteken (3,15 ± 0,26) 134,67% volt magasabb a receptor expresszió, mint az MBC nélküli, csak E2-vel és T3-mal kezelt csoporton (1,8 ± 0,95). A hozzáadott E2 kezelés a korábbi T3-as kezeléshez képest 23%-kal eredményezett magasabb receptorszámot. Végül az E2-vel és T4-gyel kezelt sejtpopulációk (1,76 ± 0,98) 163,19%-kal kevesebb TR α receptort expresszáltak az MBC-vel, E2-vel, T4-gyel kezelt csoporthoz viszonyítva (3,39 ± 0,28).

TR β receptorok expressziójának változása kezelések hatására



5. ábra: a TR β receptorfehérjék expressziója, hormon és kámfor kezelés hatására. A TR β receptorfehérjék expresszióját az oszlopok magassága jelöli, kezeletlen, majd MBC kezelt, T3; T3 és MBC kezelt, E2 és T3; E2, T3 és MBC kezelt, E2 és T4; E2, T4 és MBC kezelt sejtpopulációkon. Az y tengelyen ábrázolt értékek a mért fehérje expressziójának mértékét mutatják a kontroll csoport expressziójához képest. Az oszlopok felett jelzett csillagok a jelölt oszlopok közti szignifikáns különbséget mutatják (* p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001).

A TR β receptorok expressziója (5. ábra) kontroll csoportok (1 ± 0,35) esetén 59,67%-kal bizonyult kevesebbnek, mint MBC-vel kezelt csoportoknál (1,6 ± 0,48). A T3-mal kezelt csoportoknál (1,72 ± 0,35) 23,22%-kal több receptor expressziót detektáltunk, a T3 és MBC kezelt csoportokhoz (1,49 ± 0,31) képest. Emellett 72%-kal mutatott magasabb

receptorszámot a T3-mal kezelt csoport az kontrollcsoporthoz viszonyítva. 23,72%-kal mértünk magasabb TR β kifejeződést a T3-mal, E2-vel és MBC-vel kezelt csoportokon ($1,81 \pm 0,2$), a hasonló, ám MBC nélküli sejtpopulációhoz ($1,57 \pm 0,42$) képest. 14,75%-kal bizonyult magasabbnak a T3 kezelt populáció, a T3 és E2 kezelt sejtcsoporthoz képest. A T4-gyel, és E2-vel kezelt sejtpopulációknál ($1,39 \pm 0,41$) 22,19%-kal mértünk kisebb receptor expressziót, mint a T4-gyel, E2-vel és MBC-vel kezelt sejtek ($1,61 \pm 0,18$) esetében. 18,75%-kal bizonyult magasabbnak az E2 mellett az aktív pajzsmirigyhormonnal kezelt sejtcsoportokban megjelenő TR β receptorok száma, az E2 és T4 kezelt csoportokhoz képest.

Megbeszélés

A sejtek az őket érő külső hatásokra többek között receptorfehérjéik expressziójának változtatásával tudnak reagálni. Eredményeink kimutatták, hogy a MBC hatására a sejtek megnövelik mind a TR α , mind a TR β receptorfehérje expressziójukat. A receptorok upregulációja akkor következik be, amikor a sejt nem kap elegendő hormonhatást, tehát folyamatosan alacsony a hormon szintje a vérben. Ezen tények ismeretében az eredményeink alátámasztják, hogy a kámfor képes a pajzsmirigyhormon hatását legátolni. A folyamat hatásmechanizmusa még nem ismert, lehetséges, hogy a kámfor befolyásolja a TR α és TR β átíródását is, mRNS szinten, vagy akár az mRNS átíródás előtt, esetleg a transzláció előtt, de előfordulhat, hogy egy szállítóenzimet befolyásolva gátolja a pajzsmirigyhormont. A pajzsmirigyhormon hiánya számos, akár súlyos betegséget képes kialakítani, attól függően, hogy melyik korban, milyen mértékben jelentkezik. A pajzsmirigy-alulműködése veleszületett vagy fiatal korban kialakult, mixödémával, szellemi visszamaradottsággal, hipogonadizmussal járó, kreténizmusnak nevezett kórképet alakít ki emberben és állatban egyaránt. A kritikus időszakban, a fejlődés korai szakaszában alacsonyan maradó TH szint vezethet egyaránt a mielinhüvely fejlődésének elmaradásához és a sejtmigráció hiányához. Ezen események defektusa vezet a későbbi életben viselkedésbeli és teljesítménybeli visszamaradottsághoz. A hormon hiánya a kisagyban az idegsejtek ingerelhetőségét csökkenti, és az idegingerület jelátvivő anyagok transzportját károsítja, így motorikus és lokomotorikus funkciók leromlását eredményezi. A pajzsmirigyhormonok sokszínű reguláló hatására utal az is, hogy míg az aktív pajzsmirigyhormon elsősorban serkenti az idegrendszeri fejlődést, addig a T4 nem genomikus úton gátolja az aktin polimerizációt, és az iodotironin dejodináz aktivitását, mely a pajzsmirigyhormonok aktiválásáért és inaktiválásáért felelős enzim [34] [35]. Eredményeink kimutatták, hogy az kámfor ismeretlen hatásmechanizmussal, de befolyásolja mind a TR α , mind a TR β receptorfehérjék expressziójának mértékét. Méréseink alapján a TR α receptorokon többször alakított ki szignifikáns változásokat a MBC, mint a TR β receptorokon. E2-t és T3-at együtt adva a MBC kezelt sejtekhez szintén szignifikáns változást indukált, azonban az inaktív pajzsmirigyhormonnal E2-vel és MBC-vel kezelt sejtpopuláció esetében nem történt szignifikáns változás. Eredményeink és a felhasznált irodalom arra engednek következtetni, hogy az ösztradiol és a pajzsmirigyhormonok szabályozó mechanizmusai között interakció van. A két hormon befolyásolja egymás expresszióját genomiális úton, a DNS TRE (Thyroid

hormone response element) és az ERE (estrogen response element) régiókon keresztül [36]. A hormonokkal és kámmal is kezelt sejtek megnövekedett receptorfehérje expressziója visszavezethető a fentiek során említett sejt-kommunikációra. Ezen hatások az érzékenyebb fejlődő sejteken még markánsabban megjelennek. Elegendő dózisban felvett kámmal tehát előidézhethet pajzsmirigy-alulműködést.

A nem veleszületetten kialakuló pajzsmirigy-alulműködés szintén jellegzetes tünetekben nyilvánul meg. Manapság egyre gyakrabban autoimmun eredetre vezetnek vissza a pajzsmirigy limfociták gyulladásait. Ilyen kórkép a mirigy megnagyobbodásával járó Hashimoto-tireoiditisz, illetve a pajzsmirigy sorvadásával jelentkező Ord-tireoiditisz [37]. Egy felmérés szerint az európai lakosságnak 1-2%-át ez a forma érinti, 6-8%-ában látens a megbetegedés [38]. Jelenleg e kórfelműk ma még gyógyíthatatlanok, csupán L-thyroxinnal, szintetikus pajzsmirigyhormonnal kezelhetők. Ez a leggyakoribb formája a hipotireózisnak, és ugyan kialakulása autoimmun eredetű, mégis, amennyiben egy ilyen kórképben szenvedő szervezet MBC-vel érintkezik, feltételezhetően súlyosbítja a tüneteit, de mindenképpen befolyásolhatja. Emellett előfordulhat egyéb okú hipotireózis is, melyet az ED-k súlyosbíthatnak, mint pl. az endémiásan jelentkező, jódd- illetve szelénhiányos forma. A hiány oka lehet centrális, a hipotalamusz, vagy a hipofízis TRH, illetve TSH hormonjainak termelés defektjének következtében, de perifériásan, a pajzsmirigy károsodása is vezethet alulműködéshez. Ezen centrális és perifériás formák, tekintve, hogy a MBC hatásmechanizmusa ismeretlen, feltételezhetően kialakulhatnak kámmal toxikózis hatására. Ismeretes, hogy a szérumban TSH, T3 és T4 szintjeit a 12 hétig kezelt, ovariektomizált nőstény patkányokban a MBC megváltoztatta. Nem gátolja a tiroid-peroxidáz enzim működését, viszont a hipotalamusz-hipofízis-pajzsmirigy tengelyt módosítja [6] [39]. Emellett a kámmal csökkenti a szérumban T4-szintet, mely következményeképp nő a TSH szint, tehát gátolja a pajzsmirigyhormont [40] [41].

A kisagy fejlődésének egyik legfontosabb kritériuma az, hogy a kisagyi szemcsesejtek képesek legyenek vándorolni a germinatív, elsődleges zónából, a mélyebb sejtrétegek felé (a cerebellumban ún. „outside-in” vándorlás megy végbe), a Purkinje sejtek alá, a Bergmann-gliasejtek mentén. Amennyiben ez nem történik meg, a sejtek szaporodóképessége megmarad, ez pedig akár medulloblasztóma kialakulásához is vezethet.

Ez határozza meg a cerebelláris fejlődés születés utáni első időszakát. Ezt a migrációt több tényező befolyásolja, többek között a pajzsmirigyhormonok is. A pajzsmirigyhormonok

képesek az asztrocitákat EGF (epithelial growth factor) termelésre bírni, mely kulcsfontosságú növekedési faktor az idegsejtek proliferációja és átszerveződése során *in vitro* körülmények között. Az asztrocita és a pajzsmirigyhormon közötti kommunikációt lehetővé tevő bisz-tirfoszfin legátlása révén az idegsejt migráció nem zajlik le [42] [43]. A kisagyi neuronok és neuritjaik fejlődéséhez optimális környezet szükséges, mely megfelelő mennyiségű és minőségű, asztrociták által termelt laminin és fibronektin molekulákat kell, hogy tartalmazzon. Azonban pajzsmirigy-alulműködés esetén – ami megtörténhet a kámfor hatására, a TH receptorok egyensúlyának felborulása következtében – az asztrociták ezen funkciója károsodik és ekkor a laminin és fibronektin szint alacsony a sejtek környezetében, ami következményes neuron és neurit fejlődés elmaradásához és a kisagyi sejtek túlélési esélyének csökkenéséhez vezet [44]

A hipotireózis, bármilyen okú is legyen, jellegzetes tünetekben nyilvánul meg, melyek a következők: alacsony testhőmérséklet, gyakori hidegérzet, embereknél depresszió, pánikrohamok, fáradtság, izomgyengeség, akár görcsök, továbbá törekeny szaruképletek, elhízás, emésztési zavarok, mint a bél renyhésege, a mixödéma. Amennyiben a pajzsmirigy látható módon is megnagyobbodik, a mirigy nyomhatja a mellette levő légsövet, mely emberben fojtogatásérzéshez, krákogáshoz, köhécseleshez vezethet. Állatoknál, az emberi manifesztáció analógiára, a legjellegzetesebb tünet az elhízás, a bőr elvékonyodása, szőrzet ritkulása, vemhesülési zavarok, előfordul szimmetrikus szőrhullás, elbutulás, lelassult kognitív funkció. Emellett a nem kompenzált hipotireózis a szív kontraktilitás csökkenéséhez és az autonóm idegrendszer működési zavarához vezet [45] [46].

Kísérleteink eredményéből látszik, hogy a MBC hatására az ER β receptorfehérje expressziója módosult. A MBC az endometriális Ishikawa-sejtek alkalikus foszfatázaktivitásának indukálója. Az endometrium sejtjein az ösztrogénszerű aktivitásnak ez az egyik markere, a kámfor ösztrogénszerű hatással bír [47]. A MBC ezen endometriális sejtek transzaktivációját serkenti, elsősorban ER β receptor-mediálta úton, kis mennyiségben az

ER α receptoron keresztül. Emellett a MBC hatékony ER α és ER β antagonistának is bizonyult [48] [49]. Noha ezen hatásait csak nagy dózisban fejt ki, és számos endokrin diszruptor ösztrogenikus potenciálja nagyobb, mint a MBC-é, mégis számításba kell vennünk [48]. A változás jellemzően kiugró volt az összes, más anyagokat is kapott, MBC kezelt sejtcsoporton, a MBC kezeletlen sejtpopulációhoz képest. A változás szignifikanciája

az ösztrogénreceptorok esetében minden MBC-vel is kezelt sejtcsoportnál jelentős volt, a MBC-vel nem kezelt csoportokhoz képest. A csupán MBC-vel kezelt csoporthoz képest, a T3-mal, T3+E2-vel és a T4+E2-vel is kezelt csoportok szintén szignifikánsan változtak.

Ahogy a pajzsmirigyhormon-receptorok esetében, itt is jelentőségteljes az E2 és T3, illetve T4 hormonok interakciója [50]. A kontrollcsoport és a csupán T3-mal kezelt csoport között pedig felfedezhetünk szignifikánsan növekvő értéket a kontrollcsoport javára. Tehát a receptorfehérje expresszió alacsonyabb, ha T3-mal kezeljük a sejteket, mintha nem kezeljük semmivel. Az ER β receptorfehérjét tartalmazó sejtpopuláción detektálható változások, azt a következtetést engedik levonni, hogy a sejtek, endogén úton bejuttatott endokrin diszruptor hatására, receptorfehérje expresszió fokozásával reagálnak. Irodalmi adatok alapján a kámfor az ER β receptor antagonistája, enyhe ösztrogénszerű hatást képes a receptoron kifejteni. Be tud kötni az ösztrogénreceptorok ösztrogénkötő helyeire, és így a hormonreceptor komplex a DNS promóter génjében található ERE régióba beépülhet, így regulálva bizonyos gének expresszióját [51]. A kámfor hatással van az ösztroz ciklusra patkányban, szabálytalan ciklusokat alakít ki, a receptorfehérje kódoló mRNS szintjének módosításával, és mivel az emberi anyatejben is kimutatták jelenlétét, ilyen úton is befolyással lehet az emberi szervezetre [52]. Mindezek mellett hím patkányokban csökkenti a prosztatata, illetve herék méreteit, eltolja a pubertást, mivel az ösztrogénreceptorok mellett androgén receptorokra is hatással van [53].

Az ösztrogén hiánya, vagy ez esetben akadályozott hatása a pajzsmirigyhormon hiányhoz hasonlóan számos kórképet ki tud alakítani. A női nemihormon hiánya emberekben természetes körülmények között leggyakrabban a nő életének posztmenopauzális szakaszában (12 havi elmaradt menstruáció, vagy a magas FSH szint jelzi) következik be [54] [55]. Bekövetkezhet még POF kórkép folytán is (Premature ovarian failure) [56]. Ebben az esetben a petesejtek hiányoznak, vagy nem működnek megfelelően, fejletlenségükből kifolyólag, így nem termelnek ösztrodidot sem. Hipoösztrogénizmus előfordulhat még amenorrhoea esetén, ami az – életének reprodukív szakaszában levő – nem terhes nő menstruációs ciklusának elmaradása. Hiperprolaktinémiában szenvedő nők esetében a prolaktin hormon gátolja a GnRH (gonadotrop releasing hormone) szekrécióját, így a hipotalamusz-hipofízis tengelyen keresztül gátolja le a női nemi hormon termelődését [57]. Az ok sokféle lehet, de az esetek többségében az előidéző az, hogy a petesejtek érése, működése renyhül, leáll, így az ösztrodid termelésük is megszűnik. Amennyiben

természetes módon kialakult hipoösztrogénizmusban szenvedő szervezet ED-kel, MBC-vel érintkezik, a kórkép még látványosabban manifesztálódhat, még súlyosabb lehet.

Kísérletünk során az ER β receptorok szignifikánsan up-regulálódtak MBC hatására. Ez arra utal, hogy a sejt ER β receptorai MBC adás után nem érintkeznek elegendő ösztradiollal, nincs elég női nemi hormon a környezetükben, ezért több receptorfehérjét expresszálnak. A MBC elsősorban az ER β receptoron keresztül fejti ki antagonistá hatását, ez az oka annak, hogy kísérletünkben csupán ezen ösztrogénreceptor-fehérje expresszióinak változását vizsgáltuk. Ezen, mRNS expresszió modulálása révén létrejött változások az agyban, méhben és a prosztatában alakulnak ki [52] [53]. A MBC hatással van a lipid és zsír homeosztázisra is. Ezek lehetnek ösztrogénnel agonista hatások, mint a zsír raktárak és a szérumban leptin szint csökkentése. Lehet antagonistá hatása is, pl. a szérumban LH-szintre, melyet az ösztrogén csökkent, a kámför növel. Ebből kifolyólag logikus lenne, hogy a MBC befolyásolja a szexuális viselkedést, ám ennek bizonyításához további kísérletek szükségesek, ellentmondásos, nem egyértelmű kutatási eredmények miatt [58] [59]. Emellett a szérumban triglicerid szintet is csupán a MBC redukálta, míg a szérumban koleszterint, az LDL-t, a HDL-t az E2 csökkentette, míg a MBC nem volt rá hatással. Azonban, ha az E2 hatását a MBC gátolja, a hormon nem tudja kifejteni hatását, nem fogja tudni csökkenteni a szérumban koleszterint és az LDL-t, ami növeli pl. az agyvérzés és a szívinfarktus rizikóját. 12 hetes patkányokban végzett *in vivo* kísérletben kimutatták, hogy a MBC nemcsak az ER α és ER β mRNS expresszióját gátolja működésében, hanem a progeszteron, androgén, preproenkefalin és IGF-I receptorokét is. [60] [61].

A hipoösztrogénizmus, mely a fent említett eredményeink alapján kámför hatására jelentkezhet, vagy súlyosbodhat MBC hatására, jellegzetes tünetekben nyilvánul meg, mely számos szervrendszert érint. A hüvely veszít a falának vastagságából, lubrikáltságából [62], a méh fala atrofizál, a vagina pH-ja megváltozik, ami gyakran vezet UTI (urinary tract infections – húgyúti fertőzések) kialakulásához [63]. Emellett jellegzetes még a csontrendszer atrofíája, csonttrikulásra való hajlam megjelenése. A csont lecsökkent denzitása gyakran vezet a csigolyák kompressziós töréséhez. A csontok elgörbülnek, a hát meghajlik. Emellett vazomotoros jelenségek, hőhullámok is markánsak lehetnek ekkor. Egyéb, szintén a köztiagy funkciójának zavarából adódó tünetek alakulhatnak ki, melyek közül az alvászavar, depresszióra való hajlam jellegzetesek. Állatoknál napjainkban leggyakrabban ivartalanítás után találkozunk a hipoösztrogénizmus tüneteivel, melyet, mint

emberek esetében, a kámfor súlyosbíthat. Hasonló módon, itt is jellegzetes tünetekkel számolhatunk. Ezek a szimmetrikus szőrhullás, az elhízás, lelassult reakcióidő, az alapanyagcsere renyhülése.

A hypoösztrogénizmus kezelésére gyakran alkalmaznak SERM (selective estrogen receptor modulators) hatású szereket, pl. Raloxifent, posztmenopauzális csonttrikulás esetén. Ez a gyógyszer képes szelektíven ösztrogénszerű hatást kialakítani a csontsejteken, és antiösztrogénszerű hatást kifejteni a méhben. [64] [65]

Az ösztrogénnek és a pajzsmirigyhormonoknak kulcsszerepe van az agy fejlődésében is, az interneurális migrációban, gondoljunk csak a fiatalkori pajzsmirigy-alulműködés miatt manifesztálódó kreténizmusra. Az ER β cerebelláris kiiktatásával (BERKO) számos fejlődési rendellenességet detektálhatunk, melyek a kisagy neuronjainak nem megfelelő sejtstruktúrából adódnak. Vannak esetek, mikor ezek a rendellenességek csak később jelentkeznek az élet során, ahogy az Alzheimer-kórt és Parkinson-kórt is összefüggésbe hozták az ER β receptorok hibás működésével. Az ösztradiol hatásának csökkentése mellett a MBC azonban képes lehet felborítani az ösztrogénreceptorok egyensúlyát is. A megemelkedett ösztrogén szint, amit a kámfor okozta receptorok egyensúlyának felborulása alakíthat ki, képes sejt migrációt indukálni primitív külső csírahámsejt eredetű tumorban. [13]. Mindemellett a kámfornak nincsen bizonyított hatása a többi ösztrogéntípusra, az E1-re, E3-ra, E4-re nézve.

Kísérleteink eredményeképpen látszik, hogy a kámfor felborítja a hormonok egyensúlyát, beleszólhat bioszintézisükbe, hasznosulásukba, így számos megbetegedés és hiánytünet okozója lehet. Érdemes lenne e veszélyes endokrin diszruptorral a jövőben foglalkozni, kutatni hatásait, kiismerni pontosabban a hatásmechanizmusát, hogy specifikus védekezést lehessen kifejleszteni ellene, így megakadályozva a kámfor toxikózist.

Összefoglalás

A 4-metilbenzilidén-kámfor (MBC) egy terpénvázis molekula, melyet számos növényfaj termel, mint például egyes, Ázsiában fellelhető örökzöld növények, a rozmaring, és néhány, a babérfélék családjába tartozó fa. A kámfor egy széles körben használt vegyület, felhasználja többek között a kozmetikai ipar, a gyógyszeripar, de tartósítószernek is

alkalmazzák. Endokrin diszruptorként is képes viselkedni, eszerint egy olyan környezeti anyagként, amely képes a neuroendokrin rendszert befolyásolni, elsősorban a pajzsmirigyhormon és az ösztrogén jelátviteli útjain keresztül hatva. A neuroendokrin rendszer, a hormonok előállítása útján, a homeosztázis lassú, ám tartós regulátora. A pajzsmirigyhormonok és az ösztrogének ezen rendszer lényegi szabályozói, és receptoraik (tiroid receptorok; TR-ek, ösztrogénreceptorok; ER-ek) az endokrin diszruptorok legfőbb célpontjai. Kísérletünk során az MBC hatását vizsgáltuk az ER β , TR α és TR β receptorfehérjék expresszióin, szteroidmentes, primer kisagyi sejt kultúrán, a központi idegrendszer fejlődéséhez általánosan elfogadott modellen. Eredményeink kimutatták, hogy az endokrin diszruptorok szignifikánsan módosították a receptorfehérje expressziót a kisagyi sejteken, az ösztrogének és pajzsmirigyhormonok jelenlététől függően. Ezen megfigyelések vezettek minket arra a következtetésre, hogy az MBC befolyásolhatja az idegsejtek fiziológiáját, és gátolhatja az idegsejtfejlődést.

Abstract

4-methylbenzilidene-camphor (MBC) is a terpenoid molecule, produced by different plant species in Asia, such like evergreen trees, rosemary, and some trees in the laurel family. The substance is widely used by the cosmetics industry, the medical industry, and as a preservative. It can act as an endocrine disruptor, an environmental substance which can interfere with the mammalian neuroendocrine system, mainly by influencing the thyroid, and estrogen hormone signaling pathways.

The neuroendocrine system, with the production of the endocrine hormones, can control the physiology of the organism as a slow but persistent regulator of the homeostasis. The thyroid and estrogen hormones are core regulators in the aforementioned system, and their receptors (thyroid receptors; TRs and estrogen receptors; ERs) are main targets of endocrine disruption.

In our experiment we examined the effect of MBC on the expression of ER β , TR α and TR β receptors, in a steroid free primer cerebellar cell culture, a generally accepted universal model for the neuronal development of the central nervous system.

Our results show that the ED can significantly alter the expression of the receptors on the cerebellar cells, and the level of expression depend on the individual, as well as combined presence of E2 and THs. These observations suggest that MBC may influence the physiology of the nerve cells, and can alter the cerebellar development.

Irodalomjegyzék:

- [1] L. Wang, S. Andersson, M. Warner, and J.-A. Gustafsson, "Morphological abnormalities in the brains of estrogen receptor knockout mice," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 98, no. 5, pp. 2792–2796, Feb. 2001.
- [2] P. E. Micevych and M. J. Kelly, "Membrane estrogen receptor regulation of hypothalamic function.," *Neuroendocrinology*, vol. 96, no. 2, pp. 103–110, 2012.
- [3] K. Soltysik and P. Czekaj, "Membrane estrogen receptors - is it an alternative way of estrogen action?," *J. Physiol. Pharmacol.*, vol. 64, no. 2, pp. 129–142, Apr. 2013.
- [4] E. R. Prossnitz, J. B. Arterburn, and L. A. Sklar, "GPR30: A G protein-coupled receptor for estrogen.," *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 265–266, pp. 138–142, Feb. 2007.
- [5] S. Nussey and S. Whitehead, *Endocrinology*. BIOS Scientific Publishers, 2001.
- [6] C. Schmutzler, I. Hamann, P. J. Hofmann, G. Kovacs, L. Stemmler, B. Mentrup, L. Schomburg, P. Ambrugger, A. Grüters, D. Seidlova-Wuttke, H. Jarry, W. Wuttke, and J. Köhrle, "Endocrine active compounds affect thyrotropin and thyroid hormone levels in serum as well as endpoints of thyroid hormone action in liver, heart and kidney.," *Toxicology*, vol. 205, no. 1–2, pp. 95–102, Dec. 2004.
- [7] M. Song, M.-K. Song, H.-S. Choi, and J.-C. Ryu, "Monitoring of deiodinase deficiency based on transcriptomic responses in SH-SY5Y cells.," *Arch. Toxicol.*, vol. 87, no. 6, pp. 1103–1113, Jun. 2013.
- [8] L. Wang, S. Andersson, M. Warner, and J.-A. Gustafsson, "Morphological abnormalities in the brains of estrogen receptor knockout mice," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 98, no. 5, pp. 2792–2796, Feb. 2001.
- [9] X. Fan, H. Xu, M. Warner, and J.-Å. Gustafsson, "Chapter 13 – ER β in CNS: New Roles in Development and Function," in *Progress in Brain Research*, vol. 181, 2010, pp. 233–250.
- [10] S. M. Belcher, "Regulated expression of estrogen receptor α and β mRNA in granule cells during development of the rat cerebellum," *Dev. Brain Res.*, vol. 115, no. 1, pp. 57–69, 1999.
- [11] R. L. Jakab, J. K. Wong, and S. M. Belcher, "Estrogen receptor ? immunoreactivity in differentiating cells of the developing rat cerebellum," *J. Comp. Neurol.*, vol. 430, no. 3, pp. 396–409, Feb. 2001.
- [12] R. H. Price Jr. and R. J. Handa, "Expression of estrogen receptor-beta protein and mRNA in the cerebellum of the rat," 2000.
- [13] C. E. Andreescu, B. A. Milojkovic, E. D. Haasdijk, P. Kramer, F. H. De Jong, A. Krust, C. I. De Zeeuw, and M. T. G. De Jeu, "Estradiol Improves Cerebellar Memory Formation by Activating Estrogen Receptor," *J. Neurosci.*, vol. 27, no. 40, pp. 10832–10839, Oct. 2007.

- [14] F. Picou, T. Fauquier, F. Chatonnet, and F. Flamant, “A Bimodal Influence of Thyroid Hormone on Cerebellum Oligodendrocyte Differentiation,” *Mol. Endocrinol.*, vol. 26, no. 4, pp. 608–618, Apr. 2012.
- [15] K. Wallis, S. Dudazy, M. van Hogerlinden, K. Nordström, J. Mittag, and B. Vennström, “The Thyroid Hormone Receptor α 1 Protein Is Expressed in Embryonic Postmitotic Neurons and Persists in Most Adult Neurons,” *Mol. Endocrinol.*, vol. 24, no. 10, pp. 1904–1916, Oct. 2010.
- [16] T. Fauquier, F. Chatonnet, F. Picou, S. Richard, N. Fossat, N. Aguilera, T. Lamonerie, and F. Flamant, “Purkinje cells and Bergmann glia are primary targets of the TR α 1 thyroid hormone receptor during mouse cerebellum postnatal development,” *Development*, vol. 141, no. 1, pp. 166–175, Jan. 2014.
- [17] T. Scalise, A. Györffy, I. Tóth, D. Kiss, V. Somogyi, G. Goszleth, T. Bartha, L. Frenyó, and A. Zsarnovszky, “Ligand-induced changes in Oestrogen and thyroid hormone receptor expression in the developing rat cerebellum: A comparative quantitative PCR and Western blot study,” *Acta Vet. Hung.*, vol. 60, no. 2, pp. 263–284, Jun. 2012.
- [18] X. Zhao, H. Lorenc, H. Stephenson, Y. J. Wang, D. Witherspoon, B. Katzenellenbogen, D. Pfaff, and N. Vasudevan, “Thyroid hormone can increase estrogen-mediated transcription from a consensus estrogen response element in neuroblastoma cells,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 102, no. 13, pp. 4890–4895, Mar. 2005.
- [19] N. Vasudevan, N. Koibuchi, W. W. Chin, and D. W. Pfaff, “Differential crosstalk between estrogen receptor (ER) α and ER β and the thyroid hormone receptor isoforms results in flexible regulation of the consensus ERE,” *Mol. Brain Res.*, vol. 95, no. 1, pp. 9–17, 2001.
- [20] V. Somogyi, A. Györffy, T. J. Scalise, D. S. Kiss, G. Goszleth, T. Bartha, V. L. Frenyo, and A. Zsarnovszky, “Endocrine factors in the hypothalamic regulation of food intake in females: a review of the physiological roles and interactions of ghrelin, leptin, thyroid hormones, oestrogen and insulin,” *Nutr. Res. Rev.*, vol. 24, no. 01, pp. 132–154, Jun. 2011.
- [21] A. Zsarnovszky, É. G. Földvári, Z. Rónai, T. Bartha, and L. V Frenyó, “OESTROGENS IN THE MAMMALIAN BRAIN: FROM CONCEPTION TO ADULTHOOD – A REVIEW,” *Acta Vet. Hung.*, vol. 55, no. 3, pp. 333–347, 2007.
- [22] G. Jocsak, D. Kiss, I. Toth, G. Goszleth, T. Bartha, L. Frenyo, T. Horvath, and A. Zsarnovszky, “Comparison of Individual and Combined Effects of Four Endocrine Disruptors on Estrogen Receptor Beta Transcription in Cerebellar Cell Culture: The Modulatory Role of Estradiol and Triiodo-Thyronine,” *Int. J. Environ. Res. Public Health*, vol. 13, no. 6, p. 619, Jun. 2016.
- [23] A. S. Manoguerra, A. R. Erdman, P. M. Wax, L. S. Nelson, E. Martin Caravati, D. J. Cobaugh, P. A. Chyka, K. R. Olson, L. L. Booze, A. D. Woolf, D. C. Keyes, G. Christianson, E. J. Scharman, and W. G. Troutman, “Camphor Poisoning: an Evidence-Based Practice Guideline for Out-of-Hospital Management,” *Clin. Toxicol.*, vol. 44, no. 4, pp. 357–370, Jan. 2006.
- [24] H. Khine, D. Weiss, N. Graber, R. S. Hoffman, N. Esteban-Cruciani, and J. R.

- Avner, "A Cluster of Children With Seizures Caused by Camphor Poisoning," *Pediatrics*, vol. 123, no. 5, 2009.
- [25] D. Martin, J. Valdez, J. Boren, and M. Mayersohn, "Dermal Absorption of Camphor, Menthol, and Methyl Salicylate in Humans," *J. Clin. Pharmacol.*, vol. 44, no. 10, pp. 1151–1157, Oct. 2004.
- [26] M. Schlumpf, P. Schmid, S. Durrer, M. Conscience, K. Maerkel, M. Henseler, M. Gruetter, I. Herzog, S. Reolon, R. Ceccatelli, O. Faass, E. Stutz, H. Jarry, W. Wuttke, and W. Lichtensteiger, "Endocrine activity and developmental toxicity of cosmetic UV filters--an update.," *Toxicology*, vol. 205, no. 1–2, pp. 113–22, Dec. 2004.
- [27] T. I. Kichko, J. Lennerz, M. Eberhardt, R. M. Babes, W. Neuhuber, G. Kobal, and P. W. Reeh, "Bimodal concentration-response of nicotine involves the nicotinic acetylcholine receptor, transient receptor potential vanilloid type 1, and transient receptor potential ankyrin 1 channels in mouse trachea and sensory neurons.," *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 347, no. 2, pp. 529–39, Nov. 2013.
- [28] M. A. Farag, S. M. Ezzat, M. M. Salama, M. G. Tadros, and R. A. T. Serya, "Antiacetylcholinesterase activity of essential oils and their major constituents from four *Ocimum* species.," *Z. Naturforsch. C.*, Aug. 2016.
- [29] C. D. Santos and J. C. Cabot, "Persistent effects after camphor ingestion: a case report and literature review.," *J. Emerg. Med.*, vol. 48, no. 3, pp. 298–304, Mar. 2015.
- [30] J. Wang, L. Pan, S. Wu, L. Lu, Y. Xu, Y. Zhu, M. Guo, and S. Zhuang, "Recent Advances on Endocrine Disrupting Effects of UV Filters.," *Int. J. Environ. Res. Public Health*, vol. 13, no. 8, Aug. 2016.
- [31] J. K. Wong, P. R. Kennedy, and S. M. Belcher, "Simplified serum- and steroid-free culture conditions for high-throughput viability analysis of primary cultures of cerebellar granule neurons," *J. Neurosci. Methods*, vol. 110, no. 1, pp. 45–55, 2001.
- [32] R. L. Jakab, J. K. Wong, and S. M. Belcher, "Estrogen receptor beta immunoreactivity in differentiating cells of the developing rat cerebellum.," *J. Comp. Neurol.*, vol. 430, no. 3, pp. 396–409, Feb. 2001.
- [33] C. Vaillant, F. Chesnel, D. Schausi, C. Tiffoche, and M.-L. Thieulant, "Expression of estrogen receptor subtypes in rat pituitary gland during pregnancy and lactation.," *Endocrinology*, vol. 143, no. 11, pp. 4249–58, Nov. 2002.
- [34] N. Koibuchi, "The Role of Thyroid Hormone on Functional Organization in the Cerebellum," *The Cerebellum*, vol. 12, no. 3, pp. 304–306, Jun. 2013.
- [35] G. W. Anderson, "Thyroid hormone and cerebellar development," *The Cerebellum*, vol. 7, no. 1, pp. 60–74, Mar. 2008.
- [36] I. Mourouzis, A. Tzovaras, B. Armonis, A. Ardavanis, M. Skondra, J. Mimitis, D. Pectasides, and C. Pantos, "Are Thyroid Hormone and Tumor Cell Proliferation in Human Breast Cancers Positive for HER2 Associated?," *Int. J. Endocrinol.*, vol. 2015, p. 765406, 2015.

- [37] P. Caturegli, A. De Remigis, and N. R. Rose, "Hashimoto thyroiditis: clinical and diagnostic criteria.," *Autoimmun. Rev.*, vol. 13, no. 4–5, pp. 391–7.
- [38] P. Valeix, C. Dos Santos, K. Castetbon, S. Bertrais, C. Cousty, and S. Hercberg, "[Thyroid hormone levels and thyroid dysfunction of French adults participating in the SU.VI.MAX study].," *Ann. Endocrinol. (Paris)*, vol. 65, no. 6, pp. 477–86, Dec. 2004.
- [39] A. Carlé, P. Laurberg, N. Knudsen, H. Perrild, L. Ovesen, L. B. Rasmussen, T. Jorgensen, and I. B. Pedersen, "Thyroid peroxidase and thyroglobulin autoantibodies in patients with newly diagnosed overt hypothyroidism.," *Autoimmunity*, vol. 39, no. 6, pp. 497–503, Sep. 2006.
- [40] M. Schlumpf, H. Jarry, W. Wuttke, R. Ma, and W. Lichtensteiger, "Estrogenic activity and estrogen receptor β binding of the UV filter 3-benzylidene camphor: Comparison with 4-methylbenzylidene camphor," *Toxicology*, vol. 199, no. 2, pp. 109–120, 2004.
- [41] D. Seidlová-Wuttke, J. Christoffel, G. Rimoldi, H. Jarry, and W. Wuttke, "Comparison of effects of estradiol with those of octylmethoxycinnamate and 4methylbenzylidene camphor on fat tissue, lipids and pituitary hormones," *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, vol. 214, no. 1, pp. 1–7, 2006.
- [42] M. Kirby, A. Zsarnovszky, and S. M. Belcher, "Estrogen receptor expression in a human primitive neuroectodermal tumor cell line from the cerebral cortex: estrogen stimulates rapid ERK1/2 activation and receptor-dependent cell migration," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 319, no. 3, pp. 753–758, 2004.
- [43] "Thyroid hormone induces cerebellar neuronal migration and Bergmann glia differentiation through epidermal growth factor/mitogen-activated protein k... - PubMed - NCBI." [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Thyroid+hormone+induces+cerebellar+neuronal+migration+and+Bergmann+glia+differentiation+through+epidermal+growth+factor%2Fmitogen-activated+protein+kinase+pathway>.
- [44] C. B. N. Mendes-de-Aguiar, R. Alchini, J. K. Zucco, B. Costa-Silva, H. Decker, M. Alvarez-Silva, C. I. Tasca, and A. G. Trentin, "Impaired astrocytic extracellular matrix distribution under congenital hypothyroidism affects neuronal development in vitro," *J. Neurosci. Res.*, vol. 88, no. 15, pp. 3350–3360, Nov. 2010.
- [45] H. A. Drexhage, G. F. Bottazzo, L. Bitensky, J. Chayen, and D. Doniach, "Thyroid growth-blocking antibodies in primary myxoedema.," *Nature*, vol. 289, no. 5798, pp. 594–6, Feb. 1981.
- [46] M. V Makusheva and D. V Kilešnikov, "[Arrhythmia and vegetative imbalance in hypothyrosis patients].," *Ter. Arkh.*, vol. 80, no. 10, pp. 34–6, 2008.
- [47] S. O. Mueller, M. Kling, P. Arifin Firzani, A. Mecky, E. Duranti, J. Shields-Botella, R. Delansorne, T. Broschard, and P.-J. Kramer, "Activation of estrogen receptor alpha and ERbeta by 4-methylbenzylidene-camphor in human and rat cells: comparison with phyto- and xenoestrogens.," *Toxicol. Lett.*, vol. 142, no. 1–2, pp. 89–101, Apr. 2003.
- [48] S. O. Mueller, M. Kling, P. Arifin Firzani, A. Mecky, E. Duranti, J. Shields-Botella, R. Delansorne, T. Broschard, and P.-J. Kramer, "Activation of estrogen receptor

- alpha and ERbeta by 4-methylbenzylidene-camphor in human and rat cells: comparison with phyto- and xenoestrogens.," *Toxicol. Lett.*, vol. 142, no. 1–2, pp. 89–101, Apr. 2003.
- [49] M. Schlumpf, H. Jarry, W. Wuttke, R. Ma, and W. Lichtensteiger, "Estrogenic activity and estrogen receptor beta binding of the UV filter 3-benzylidene camphor. Comparison with 4-methylbenzylidene camphor.," *Toxicology*, vol. 199, no. 2–3, pp. 109–20, Jul. 2004.
- [50] Y.-S. Zhu, P. M. Yent, W. W. Chint, and D. W. Pfaff, "Estrogen and thyroid hormone interaction on regulation of gene expression," *Neurobiology*, vol. 93, pp. 12587–12592, 1996.
- [51] C. M. Klinge, "Estrogen receptor interaction with estrogen response elements.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 29, no. 14, pp. 2905–19, Jul. 2001.
- [52] O. Faass, M. Schlumpf, S. Reolon, M. Henseler, K. Maerkel, S. Durrer, and W. Lichtensteiger, "Female sexual behavior, estrous cycle and gene expression in sexually dimorphic brain regions after pre- and postnatal exposure to endocrine active UV filters.," *Neurotoxicology*, vol. 30, no. 2, pp. 249–60, Mar. 2009.
- [53] S. Durrer, C. Ehnes, M. Fuetsch, K. Maerkel, M. Schlumpf, and W. Lichtensteiger, "Estrogen sensitivity of target genes and expression of nuclear receptor coregulators in rat prostate after pre- and postnatal exposure to the ultraviolet filter 4methylbenzylidene camphor.," *Environ. Health Perspect.*, pp. 42–50, Dec. 2007.
- [54] J. Gandhi, A. Chen, G. Dagur, Y. Suh, N. Smith, B. Cali, and S. A. Khan, "Genitourinary syndrome of menopause: an overview of clinical manifestations, pathophysiology, etiology, evaluation, and management.," *Am. J. Obstet. Gynecol.*, Jul. 2016.
- [55] S. D. Harlow, M. Gass, J. E. Hall, R. Lobo, P. Maki, R. W. Rebar, S. Sherman, P. M. Sluss, T. J. de Villiers, and STRAW + 10 Collaborative Group., "Executive summary of the Stages of Reproductive Aging Workshop + 10: addressing the unfinished agenda of staging reproductive aging," *Fertil. Steril.*, vol. 97, no. 4, pp. 843–851, Apr. 2012.
- [56] L. M. Nelson, "Primary Ovarian Insufficiency," *N. Engl. J. Med.*, vol. 360, no. 6, pp. 606–614, Feb. 2009.
- [57] T. Mancini, F. F. Casanueva, and A. Giustina, "Hyperprolactinemia and Prolactinomas," *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.*, vol. 37, no. 1, pp. 67–99, Mar. 2008.
- [58] S. Shahabi, S. G. A. Jorsaraei, A. Akbar Moghadamnia, E. Barghi, E. Zabihi, M. Golsorkhtabar Amiri, G. Maliji, A. Sohan Faraji, M. Abdi Boora, N. Ghazinejad, and H. Shamsai, "The effect of camphor on sex hormones levels in rats.," *Cell J.*, vol. 16, no. 2, pp. 231–4, 2014.
- [59] S. Shahabi, S. G. A. Jorsaraei, A. A. Moghadamnia, E. Zabihi, S. M. Aghajanpour, S. N. Mousavi Kani, R. Pourbagher, S. A. Hosseini, M. Esmaili, A. A. Yoonesi, A. Zarghami, and F. Alinezhad, "Central effects of camphor on GnRH and sexual hormones in male rat.," *Int. J. Mol. Cell. Med.*, vol. 1, no. 4, pp. 191–6, 2012.

- [60] S. Durrer, K. Maerkel, M. Schlumpf, and W. Lichtensteiger, "Estrogen Target Gene Regulation and Coactivator Expression in Rat Uterus after Developmental Exposure to the Ultraviolet Filter 4-Methylbenzylidene Camphor," *Endocrinology*, vol. 146, no. 5, pp. 2130–2139, May 2005.
- [61] K. Maerkel, S. Durrer, M. Henseler, M. Schlumpf, and W. Lichtensteiger, "Sexually dimorphic gene regulation in brain as a target for endocrine disrupters: Developmental exposure of rats to 4-methylbenzylidene camphor," *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, vol. 218, no. 2, pp. 152–165, 2007.
- [62] L. A. da S. Lara, B. Useche, R. A. Ferriani, R. M. Reis, M. F. S. de Sá, M. M. S. de Freitas, J. C. Rosa e Silva, and A. C. J. de S. Rosa e Silva, "The effects of hypoestrogenism on the vaginal wall: interference with the normal sexual response.," *J. Sex. Med.*, vol. 6, no. 1, pp. 30–9, Jan. 2009.
- [63] M. G. F. Sartori, P. C. Feldner, Z. I. K. Jarmy-Di Bella, R. Aquino Castro, E. C. Baracat, G. Rodrigues de Lima, and M. J. B. Castello Girão, "Sexual steroids in urogynecology," *Climacteric*, vol. 14, no. 1, pp. 5–14, Feb. 2011.
- [64] A. J. J. Wood, B. L. Riggs, and L. C. Hartmann, "Selective Estrogen-Receptor Modulators — Mechanisms of Action and Application to Clinical Practice," *N. Engl. J. Med.*, vol. 348, no. 7, pp. 618–629, Feb. 2003.
- [65] D. B. Muchmore, "Raloxifene: A selective estrogen receptor modulator (SERM) with multiple target system effects.," *Oncologist*, vol. 5, no. 5, pp. 388–92, 2000.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet nyilvánítani témavezetőimnek, Jócsák Gergelynek és Kiss Dávid Sándornak, amiért lehetővé tették számomra, hogy bekapcsolódhassak a kutatási munkálatokba. Hálás vagyok nekik, amiért a kutatási téma elméleti háttérét alaposan és türelemmel adták át nekem.

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

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

Nem utolsósorban köszönöm családom, párom, barátaim segítségét, támogatását és türelmét, amivel a dolgozatom elkészítése során ajándékoztak meg. Illetve köszönöm Elzának és Mihálynak a folyamatos bátorítást és támogatást.

HuVetA - SZIA
ELHELYEZÉSI MEGÁLLAPODÁS ÉS SZERZŐI JOGI NYILATKOZAT*

Név: HARASZTI ZSUZSANNA.....

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

A feltöltendő mű címe: Q1 pajzsmirigy- és ösztrogén-receptor-proteinek expresszióját
károsító anyag, a kódufor vizsgálata fejlődő primer kóduagi rektulhárak.....

A mű megjelenési adatai: szakdolgozat.....

Az átadott fájlok száma: 1.....

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

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

Kijelenti, hogy a 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/SZIA-ban tárolt művek korlátlanul hozzáférhetővé váljanak a világhálón,
- a Szent István Egyetem belső hálózatára (IP címekre) korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,
- a SZIE Állatorvos-tudományi 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),
- nem engedélyezi a feltöltött dokumentum(ok) elérését és a dokumentum bibliográfiai adatainak nyilvánossá tételét a HuVetA-ban/SZIA-ban.

* Jelen nyilatkozat az 5/2011. számú, A Szent István Egyetemen folytatott tudományos publikációs tevékenységgel kapcsolatos adatbázis kialakításáról és alkalmazásáról című rektori utasításhoz kapcsolódik, illetve annak alapján készült.

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

Budapest, 2012. évXI.....hó ...21.....nap



aláírás

szerző/a szerzői jog tulajdonosa

A HuVetA Magyar Állatorvos-tudományi Archívum – Hungarian Veterinary Archive a Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Könyvtár, Levéltár és Múzeum által működtetett szakterületi online adattár, melynek célja, hogy a magyar állatorvos-tudomány és -történet dokumentumait, tudásvagyonát elektronikus formában összegyűjtse, rendszerezze, megőrizze, kereshetővé és hozzáférhetővé tegye, szolgáltassa, a hatályos jogi szabályozások figyelembe vételével.

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

- a magyar állatorvos-tudomány hazai és nemzetközi ismertségének növelése;
- a magyar állatorvosok publikációira történő hivatkozások számának, és ezen keresztül a hazai állatorvosi folyóiratok impakt faktorának növelése;
- az Állatorvos-tudományi Kar 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.

A SZIA Szent István Archívum a Szent István Egyetemen keletkezett tudományos dolgozatok tára.

5. melléklet

Nyilatkozat TDK- és szakdolgozat azonosságáról

NYILATKOZAT

Alulírott HARASZTI ZSUZSANNA nyilatkozom, hogy szakdolgozatom,
melynek címe 4. pyrazinon- és óntrogén receptor proteázok szerepét károsító anyagok
a tuberkulózis kezelésében
tartalmi és formai szempontból teljes mértékben megegyezik azonos című, a 2016
évi TDK konferencián szerepelt dolgozatommal.

Budapest, 201. IX. 23.

K-H Z

a hallgató neve és aláírása

NYILATKOZAT

Alulírott KARASZTI ZSUZSANNA..... nyilatkozom, hogy szakdolgozatom,
melynek címe 191... pajzsmirigy- és ösztrogén receptor proteinek expresszióját
hatóanyag, a Tdusfor vizsgálata fejlődő miuon szilagyi szilagihirak
tartalmi és formai szempontból teljes mértékben megegyezik azonos című, a 2016
évi TDK konferencián szerepelt dolgozatommal.

Budapest, 2017. VII. 14.....



KARASZTI ZSUZSANNA Kati Z

a hallgató neve és aláírása

Alulírott FÓCSAK BERGELY igazolom, hogy

KARASZI ZSUZSANNA (a hallgató neve)

eljárásny - és ösztrogén receptor proteinek expremióját bevonó anyag a Rabufor utjálata
fejlődő mivvel biológiai sejtkultúrák
című szakdolgozatát ismerem, azt beadásra és védésre alkalmasnak tartom.

Budapest, 2017. XI. 14.

FÓCSAK BERGELY

a témavezető neve és aláírása

ÉLETTANI ÉS BIOKÉMIAI TSZ.

tanszék

