

**KÖRNYEZETI HATÓTÉNYEZŐK ENDOKRIN DISZRUPTOR
(ED) HATÁSAINAK EXPERIMENTÁLIS VIZSGÁLATA ÉS
KAPCSOLATOK KERESÉSE A KARDIOVASZKULÁRIS
KLINIKAI GYAKORLATTAL**

Doktori (PhD) értekezés tézisei

dr. Hausinger Péter

Témavezető: Dr. habil Gálfi Márta
Társtémavezető: Dr. Sepp Krisztián

Biológia Doktori Iskola

**Szegedi Tudományegyetem
JGYPK & ÁOK
Környezettoxikológiai Kutató Műhely**

2021

A doktori eljárás alapját képező 2 db közlemény

Hausinger, P; Ungi, I; Szántó, G; Hajtman, L; Forster, T; Regar, E; Thury, A: Intracoronary thrombus on optical coherence tomography in a patient with variant angina : treatment and follow-up. *International journal of cardiology* 176: 1 pp. e32-e35. (2014) **IF: 4,036**

Hausinger, P; Sasi, V; Volford, G; Bitay, M; Bogáts, G; Thury, A; Palkó, A; Forster, T; Nemes, A: Unruptured aneurysm of the left sinus of Valsalva compressing the left main coronary artery - Successful percutaneous treatment. *Herz* 39: 6 pp. 770-773. (2014) **IF: 0,690** **összes IF: 4,726**

A disszertáció témájához kapcsolódó közlemények, melyeken a tézisek alapulnak (Közl.)

(1) Molnar, Z; Palfoldi, R; Laszlo, A; Radacs, M; Laszlo, M; **Hausinger, P**; Tiszlavicz, L; Razga, Z; Valkusz, Z; Galfi, M: The Effects of Hypokalaemia on the Hormone Exocytosis in Adenohypophysis and Prolactinoma Cell Culture Model Systems. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes* 122(10): 575-581. (2014) IF: 1,555

(2) Molnar, Z; Palfoldi, R; Laszlo, A; Radacs, M; Sepp, K; **Hausinger, P**; Tiszlavicz, L; Valkusz, Z; Galfi, M: Effects of chronic and subtoxic chlorobenzenes on adrenocorticotropic hormone release *JOURNAL OF ENVIRONMENTAL SCIENCES* 34 pp. 165-170. (2015) IF: -

(3) **Hausinger, P**; Ungi, I; Szántó, G; Hajtman, L; Forster, T; Regar, E; Thury, A: Intracoronary thrombus on optical coherence tomography in a patient with variant angina: treatment and follow-up. *International journal of cardiology* 176: e32-e35. (2014) IF: 4,036

(4) **Hausinger, P**; Sasi, V; Volford, G; Bitay, M; Bogáts, G; Thury, A; Palkó, A; Forster, T; Nemes, A: Unruptured aneurysm of the left sinus of Valsalva compressing the left main coronary artery - Successful percutaneous treatment. *HERZ* 39 (6): 770-773. (2014) IF: 0,690

(5) Nagyeri, G; Valkusz, Z; Radacs, M; Ocsko, T; **Hausinger, P**; Laszlo, M; Laszlo, FA; Juhasz, A; Julesz, J; Galfi, M: Behavioral and endocrine effects of chronic exposure to low doses of chlorobenzenes in Wistar rats. *Neurotoxicology and teratology* 34: 9-19. (2012) IF: 3,181

(6) Valkusz, Z; Nagyeri, G; Radacs, M; Ocsko, T; **Hausinger, P**; Laszlo, M; Laszlo, FA; Juhasz, A; Julesz, J; Palfoldi, R et al.: Further analysis of behavioral and endocrine consequences of chronic exposure of male Wistar rats to subtoxic doses of endocrine disruptor chlorobenzenes. *Physiology & behavior* 103: 421-430. (2011) IF: 2,869 **összes IF: 12,326**

A Ph.D. tézisekhez felhasznált egyéb szakmai anyagok

(7) Zsolt Molnár, **Péter Hausinger**, Marianna Radács, Anna László, Márta László, Zsuzsanna Valkusz, Regina Pálföldi, Krisztián Sepp and Márta Gálfi: Investigation of the effect of sugar replacement compounds on adrenaline-activated AVP secretion. 34th ECNP Congress, Lisbon, Portugal, poster number: P.1059 (2021), 1 p.

(8) **Péter Hausinger** and Krisztián Sepp, Attila Csicsor, Marianna Radács, Zsolt Molnár and Márta Gálfi: Chlorobenzene compounds as possible immuno-disruptor agents. In: Alapi, Tünde; Berkecz, Róbert; Ilisz, István (szerk.) Proceedings of the 26th International Symposium on Analytical and Environmental Problems

Szeged, Magyarország: University of Szeged (2020) 405 p. pp. 157-161., 5 p

(9) **Péter, Hausinger** and Krisztián, Sepp; Andrea, Csikós; Marianna, Radács; Zsolt, Molnár; Márta, Gálfi: Effect of subtoxic dose, extreme low frequency (ELF) electromagnetic field (EMF) treatments on liver enzyme changes in in vivo turkey model experiments. In: Alapi, Tünde; Berkecz, Róbert; Ilisz, István (szerk.) Proceedings of the 26th International Symposium on Analytical and Environmental Problems, Szeged, Magyarország: University of Szeged (2020), pp. 310-314., 5 p.

(10) Zsolt Molnár, **Péter Hausinger**, Krisztián Sepp, Marianna Radács, Anna László, Márta László, Andrea Csikós, Regina Pálföldi and Márta Gálfi: The connection between serotonin activated arginine-vasopressin release regulation and sugar substitutes. 33rd ECNP Congress *Virtual*, <https://www.ecnp.eu/about-ecnp/history/past-ecnp-meetings/past-congresses/virtual-2020>, (2020), 1 p.

- (11) Idikó, Trója; István, Varga; Anna, Gutási; **Péter, Hausinger**; Zsolt, Molnár; Andrea, Serester; Márta, Gálfi; Marianna, Radács: Remodelling of LCA compatible environmental loading. In: Alapi, Tünde; Ilisz, István (szerk.) Proceedings of the 25th International Symposium on Analytical and Environmental Problems Szeged, Hungary, University of Szeged. (2019) 464 p. pp.: 418-420., 3p.
- (12) István Varga, Zsolt Molnár, Anna Gutási, Ildikó Trója, **Péter Hausinger**, Marianna Radács, Márta Gálfi: The investigation of sugar substitute compounds on neuroendocrine functions – in environmental loading model . In: Alapi, Tünde; Ilisz, István (szerk.) Proceedings of the 25th International Symposium on Analytical and Environmental Problems (2019) 464p. pp.421-423pp. 3p.
- (13) Radács, M; Molnár, Z.; Sepp, K.; **Hausinger, P.;** Racz, L.; Valkusz, Zs.; Balla, Z.; Gálfi, M.: The role of endocrine disrupting compounds effects in endocrine network diseases. Obesity Facts 11. Suppl. 1p. 210 (2018)

Rövidítések jegyzéke

5-HT: szerotonin	mCIB: TCIB+HCIB
ACTH: adrenokortikotrop hormon	MMP: mátrix-metalloproteáz
AdH: adenohipofízis sejtkultúra	MU: monuron
AVP: arginin-vazopresszin	NA: noradrenalin
Bcl-2: B-sejt limfoma protein-2	nED: neuroendokrin diszruptor
B: kortikoszteron	NH: neurohipofízis
CIB: klórbenzol	nNOS: neurális nitrogén monoxid-szintáz
CRP: C-reaktív protein	NO: nitrogén-monoxid
CT: komputertomográfia	NOS: nitrogén-monoxid szintáz
DAG: diacil-glicerol	NSTEMI: non-ST elevációs miokardiális infarktus
dCIB: 1,4-diklórbenzol	OCT: optikai koherencia tomográfia
DU: diuron	OF: open field teszt
ED: endokrin diszruptor	OT: oxitocin
EDC: endokrin diszruptor vegyület	PAP/DAB: 3,3-diaminobenzidin tetra-hidroklorid
eNOS: endoteliális nitrogén-monoxid szintáz	POP: perzisztens szerves szennyező
EPM: elevated plus maze teszt	PRL: prolaktin
ER: ösztrogén receptor	PRLOMA: prolaktinomás adenohipofízis sejtkultúra
FFR: frakcionális flow rezerv	PU: fenuron
GGT: gamma-glutamil-transzpeptidáz	RDA: ramus descendens anterior
HCIB: hexaklórbenzol	RI: resident intruder teszt
HMT: hipofízis-mellékvesekéreg tengely	RIA: radioimmunoassay
HTP: humán toxicitási potenciál	ROCK: RhoA/Rho-kináz útvonal
IFN- γ : interferon- γ	ROS: reaktív oxigén gyök
IL: interleukinok	SGOT: glutamát-oxálacetát-transzamináz
IR: immunoreaktív	SGPT: glutamát-piruvát-transzamináz
IVUS: intravaszkuláris ultrahang	SON: nucleus supraopticus
KvD: Kardiovaszkuláris Diszruptor	TNF- α : tumornekrózis faktor
KvDV: Kardiovaszkuláris Diszruptor Vegyület	ttg kg: testtömeg kilogramm
LIA: immunokemilumineszcencia	

BEVEZETÉS

A XX. század végén a környezeti feltételek megváltozása a homeosztatis hálózati működésben a bemeneti jelek módosulását eredményezte, ami eltérő biológiai rendszerválaszokat generált. Ezek következményesen működési zavarokként jelennek meg, pl. az emberi szervezetben betegségeket okozva. Ilyen módon a környezeti kapcsolataival működésben tartott emberi szervezet egyes hatótényező expozíciókra zavart működést, azaz diszruptor funkciókat generál. Amennyiben egy hatótényező rendszerzavart vált ki, ez közvetetten vagy közvetlenül hat a perifériás fiziológiai folyamatokra pl. kardiovaszkuláris funkciókra. Jelen munkában, a kardiovaszkuláris (elsősorban érszűkület: vazokonstriktio, aneurizma) zavarok és az endokrin diszruptor (ED) események párhuzamosságait kerestem. A hatótényezők: klórbenzolok (mCIB: klórbenzol keverék), fenilurea ágensek, kémiai környezeti terheléseként napjainkban is jelentősek diszruptor hatásaik miatt. A lehetséges ED hatás kutatása az endokrin és neuronális rendszerkapcsolatok közös szabályozási csomópontjainak különböző biológiai komplexitási szintjeire irányul (pl. a celluláris funkciót meghatározó - aktív hormon exocitózis: arginin-vazopresszin /AVP/, oxitocin /OT/, adrenokortikotrop hormon /ACTH/, prolaktin /PRL/; továbbá organizmus szinten endokrin szabályozási ciklusok (pl. hipofízis/mellékvesekéreg tengely és/vagy elemei vizsgálatával). Az ED hatások tanulmányozásában a humán vonatkozásokkal összefüggő párhuzamosságok feltárása az AVP, OT, a noradrenerg, szerotonerg pályarendszer és szabályozás; az ACTH, PRL, hipofízis/mellékvesekéreg tengelyműködés és szabályozás, az extracelluláris ionmillieu vonatkozásában lehet karakterisztikus a kardiovaszkuláris regulációkkal összefüggésben. Mivel a kardiovaszkuláris betegségek magas halálozással járó betegségcsoportok, így környezettoxikológiai szempontú tanulmányozásuk igen indokolt. Mindezt az is alátámasztja, hogy az érszűkület zavarai kapcsán a környezeti kémiai hatótényezők közül csak a dohányzás, drog és alkohol szerepével foglalkoznak a kardiovaszkuláris betegségek diagnosztikáját és ellátását célzó nemzetközi (európai, amerikai, japán) ajánlások.

Az ED hatások különféle hatótényezők kapcsán való nemzetközi kutatása már előrehaladott, viszont a kutatási eredmények összehasonlíthatósága nehézkes. Ennek megoldására a társadalom technológiai szabványainak kutatásokra vonatkozó adaptálása szolgálhat. A klórbenzol (CIB) és fenilurea hatótényezők *in vivo* és *in vitro* hatáskövetésében a szabványkompatibilis eredménykialakítás nagy jelentőségű. A hatótényezők kiváltotta környezettoxikológiai események ED vonatkozásai, valamint az érszűkület meghatározó mechanizmusok csomóponti kapcsolatainak feltárása a klinikumban új irányokat jelölhet ki mind a diagnosztika, mind a terápia tervezések során.

CÉLKITŰZÉS

Jelen munkában a halogénezett és/vagy aromás szénhidrogén hatótényezők ED hatásait kutattam, *in vivo* és *in vitro* állatkísérletes modellekben, keresve a feltárt hatások háttérmechanizmusait. Stratégiai célom volt, a vizsgált hatótényezők ED hatásait kutatva a kapcsolat megkeresése egyes, a periférián kialakuló kardiovaszkuláris patológiás eseményekkel. A környezettoxikológiai kutatási eredményeinket az alátámasztó biológiai mechanizmusokkal az orvosi diagnosztikában, a preventív medicinában és az esetleges terápia tervezések során kívántam hasznosítani az érszűkület, vagy aneurizma képződéssel járó kardiovaszkuláris megbetegedések eseteiben.

A fent vázoltak kutatásához a következő problémakörök megoldására kerestem a választ, illetve a további kutatásaimhoz feltárandó tématerületeket kívántam meghatározni.

1. A munka során első igénypont a standardizált *in vivo* és *in vitro* állatkísérletes (Wistar patkány) vizsgálati modellek kialakítása, amelyekben a(z)

a, táplálkozási expozíció útvonala beállítása volt az elsődleges cél.

b, adenohipofízis általunk indukált prolaktinomás transzformációja igazoltan megvalósul, ezáltal olyan kutatási modell kialakítása, amellyel patológiás állapotokban is tanulmányozhatók az expozíció események.

c, kémiai terhelést jelentő hatótényezők (mCIB: 1,2,4-triklórbenzol /TCIB/+ hexaklórbenzol /HCIB/) *in vivo* expozícióinak szubtoxikus dózisa és a kezelési időtartamok meghatározása.

2. A neuroendokrin reguláció környezeti hatótényezőkre bekövetkező esetleges változásainak a tanulmányozása azt a célt is szolgálta, hogy az endokrin hatások mellett feltárásra kerüljenek azok a kapcsolt *celluláris* mechanizmusok is, amelyek a vazospasztikus angina vagy az aneurizmák kialakulásában szerepet játszhatnak. Vizsgálandó volt továbbá, hogy *organizmus* szinten detektálhatók-e az *in vivo* mCIB kezelések hatásai (szérum hormonszintekben és viselkedési elemek módosulásaiban). Valamint a kapott eredmények összefüggésbe hozhatók-e a vazospasztikus angina vagy az aneurizmák kialakulásával?

a, A 2. célkitűzési pont tanulmányozásához először az adenohipofízis esszenciális ACTH hormonelválasztásának vizsgálata; majd a regulációs mechanizmusok követéséhez a *hipotalamusz-hipofízis-mellékvesekéreg tengely* működésének *in vitro* adenohipofízis sejtkultúra (AdH) és prolaktinomás adenohipofízis primer sejtkultúra (PRLOMA) szabályozási ciklusmodell kialakítása volt a cél.

2aa, A beállított, standardizált kísérleti rendszerben tanulmányozni kívántam továbbá, hogy a CIB-ok és fenilurea kezelések mennyire érintik az ACTH és a PRL release-t?

2ab, Az *in vivo* CIB kezelés megváltoztatta-e a vérplazma ACTH tartalmát?

2ac, Továbbá vizsgáltam, hogy a CIB expozíciók a Mg^{2+} -ATPáz aktivitására milyen hatással vannak?

b, A *celluláris* és *organizmus* szintű kutatási protokollok összekapcsolásával kívántam tanulmányozni a neurohipofízis monoamin (NA /noradrenalin/, 5-HT /szerotonin/) aktivált *in vitro* (neurohipofízis sejtkultúra: NH) ciklusmodelljében az *in vivo* CIB (mCIB: TCIB+HCIB) kezelések hatásait az AVP és OT elválasztására.

2ba, Továbbá, vizsgálni kívántam, hogy az *in vivo* mCIB kezelések miként hatnak a plazma AVP és OT tartalmára? Fontos volt stratégiai céloom szempontjából (az extrapoláláshoz), hogy az esetlegesen detektálható változás összefüggésbe hozható-e az *in vitro* CIB hatáseredményekkel?

c, Jelentős kérdéskört képviselt az organizmus szinten zajló kutatások során, hogy az AVP és/vagy OT által is mediált viselkedésmintázatok a CIB-ok jelenlétében mutatnak-e értékelhető változásokat? Továbbá, milyen általános *celluláris* mechanizmusokkal hozhatók kapcsolatba az észlelt hatások?

3. A közvetett ED hatás vizsgálatához lokális, extracelluláris ionmillieu (pl. $[K^+]$) változások kutatási modelljében kívántam tanulmányozni, miként valósul meg az egészséges és transzformált sejtek relációjában a környezeti hatótényezőkre kialakított válaszméchanizmus? Továbbá a hatótényező/hatáseredmények milyen alap-

mechanizmussal zajlanak? Ezen kérdéskör megválaszolásához az alábbi részcélokat kívántam vizsgálni:

a, Első lépésben a kutatási követelményeket kielégítő *in vitro* vizsgálati protokoll kialakítása volt a cél.

b, Majd a kitűzött cél szerinti kérdés megválaszolásához vizsgáltuk, hogy az *in vitro* AdH és PRLOMA sejtek lokális hipokalémiában miként változtatják meg az esszenciális (ACTH) és nem esszenciális (PRL) hormon release funkciókat és ezek a két modellben mennyire eltérőek?

3ba, Továbbá, milyen mechanizmussal hozhatók összefüggésbe a hipokalémiában észlelt hormonelválasztási kinetikák.

4. Az experimentális tapasztalatok alapján merült fel a kérdés, miszerint az ED vegyületek kiválthatnak-e olyan kardiovaszkuláris hatásokat, amelyek funkcionálisan a vazospazmushoz, vagy strukturálisan aneurizma megjelenéséhez vezetnek?

a, Jelen kérdéskör tanulmányozásához először a nevezett betegségek invazív diagnosztikus és terápiás megoldásait kell vizsgálni:

1. vazospasztikus angina esetén; **2.** aneurizma esetén.

b, Ezután vizsgálandó, hogy a tanulmányozni kívánt betegségek kialakulásában milyen lehetséges szereppel bírhatnak a környezettoxikológiai szempontból jelentős ED vegyületek?

MÓDSZEREK

Alkalmazott expozíciók és kísérleti csoportok

Kísérleteinkben ♂ Wistar törzszű patkányokat HCIB és TCIB 1:1 arányú keverékével (mCIB) kezeltük, gasztrointesztinális expozícióban (mCIB: 10,0 vagy 1,0 vagy 0,1 µg/ttg kg /ml dózis, 0, 30, 60 és 90 napon át). *Kontroll csoportok:* - Abszolút, stressz, negatív és pozitív kontrollok. A mCIB expozíciók megfelelő időpontjaiban viselkedésvizsgálatokat (agresszivitást: RI, szorongást OF és EPM tesztekkel) vizsgáltuk. Majd alvadésgátlót és natív vérmintából OT, AVP és PRL hormonokat RIA, az ACTH-t LIA módszerrel detektáltuk, a máj funkciókat jelző májtranszferáz enzim volumeneket (SGOT, SGPT, GGT is mértük. A kezelt patkányok hipofíziséből primer, monolayer NH, AdH sejt kultúrákat készítettünk. A NH kultúrák 5-HT és NA mediált AVP és OT elválasztását RIA módszerrel követtük.

Prolaktinomás adenohipofízis in vivo indukciója ösztrom-acetát implantációval: Az *in vivo*, 6 hónapon át, szubkután beültetett ösztrom-acetáttal (150 µg/ttg kg/hét) Wistar törzszű nőstény patkányoknál prolaktinomás adenohipofízis megjelenését indukáltuk, aminek sikerességét a plazma PRL szinttel követtük. A prolaktinomás adenohipofízisből sejtenyészeteket készítettünk (PRLOMA).

Adenohipofízis (AdH) monolayer sejt kultúrák: A Wistar patkányok adenohipofíziséből enzimatis és mechanikus disszociálattással és sejtenyésztési technikák adaptálásával AdH-t készítettünk. A sejtek ACTH tartalma és elválasztása szerint: specifikus (AVP) és aspecifikus stimulálással azokat standardizáltuk. A konfluens, primer, monolayer AdH tenyészeteket morfolometriai, sejtranszformációs tulajdonságok, energia transzfer, membránfunkciók tekintetében kontrolláltuk a kísérletek során.

A ***PRLOMA sejt kultúra*** modellek kialakítása az AdH monolayer sejt kultúrák előállítási és standardizálási metodikájában leírtaknak megfelelően történt.

Neurohipofízis (NH) monolayer sejt kultúrák: A Wistar patkányokból primer, monolayer NH tenyészetet készítettünk, az IR OT és AVP tartalmat és release-t követtük,

morfometriai, sejtranszformációs viselkedés, energiáttranszfer, membránfunkciók tekintetében.

In vitro kísérletek: A monolayer AdH és NH kultúrák in vitro kísérletiben 0, 5, 10, 20, 30, 60, 120 percesben mintákat vettünk, RIA vagy LIA módszerekkel hormontartalmakat mértünk. Az ACTH elválasztást AVP, az NH hormonok (AVP, OT) release-t monoaminokkal (5-HT, NA) aktiváltuk és az idő- és dóziskinetikákat is detektáltuk a kísérleti protokollok beállításához.

Diszruptor hatással kiváltható extracelluláris hipoiónia modellezés: A közvetett diszruptor hatások vizsgálatához in vitro AdH és PRLOMA modellekben hipokalémiás kísérleti protokollt alkalmaztunk. Az extracelluláris izoállapotok megtartásával a PRLOMA és AdH sejtkultúrák releaselt ACTH és PRL kinetikáikat, $t = 10, 20, 30, 60$ and 90 percen át követtük hipokalémiában. **Immunhisztokémiai vizsgálatok:** A NH és AdH hormontartalmait specifikus anti-hormon antitesttel, PAP/DAB módszerrel vizsgáltuk. A hipokalémiás kísérleteknél szintén PAP/DAB módszerrel vizsgáltuk az apoptózist Bcl-2 specifikus immuncitokémiai festéssel.

Mg²⁺-ATP-áz meghatározás: A Mg²⁺-függő ATP-áz aktivitás meghatározása módosított Martin-Dotty módszerrel történt. Az ATP-áz aktivitás értékeit a kontroll %-ában fejeztük ki.

HCIB és Uron kezelések: A NH sejtkultúrák kezelésekor mCIB (0,1- 1,0 $\mu\text{g/ml}$) és az uronok 10^{-6} M (fenuron /PU/, diuron /DU/, és monuron /MU/) dózisban, a NH hormonregulációját NA és 5-HT jelenlétével modellezve az alaprelease és monoamin aktivált AVP és OT volumeneket detektáltuk különböző kombinációkban.

Hormonmérések: Az in vivo kezelt állatok plazmájából és a NH, AdH és PRLOMA felülúszó médiumaiból AVP/OT (RIA) koncentrációkat, ACTH (LIA) és PRL (RIA) hormonokat határoztunk meg.

Statisztikai analízis: Az eredményeket IBM SPSS és SAS programmal, ANOVA módszerekkel, Fisher-féle post hoc eljárással, Kruskal-Wallis nem-paraméteres módszerrel, Mann-Whitney U-eljárással dolgoztuk fel.

Betegek és alkalmazott klinikai módszerek: A kardiovaszkuláris vazospasmus és aneurizma egy-egy esettanulmányban került bemutatásra, invazív és non invazív klinikai beavatkozásokkal (koszorúér angiográfia - FFR, OCT, IVUS, CT) diagnosztika és terápiás megoldásokkal együtt.

MEGBESZÉLÉS AZ EREDMÉNYEK ALAPJÁN

A disszertációban a környezettoxicológiai hatótényezők közül az aromás szénhidrogének és halogénezett származékaik lehetséges ED hatásait kívántam tanulmányozni azzal a további igénnyel, hogy a kapott eredmények alapján kapcsolatot tárhassak fel humán patológiás folyamatokkal, nevezetesen a koszorúerspazmussal vagy aneurizma kialakulással. Az expozítorok kiválasztását az támogatta, hogy igen széles körű és magas a környezetben az előfordulási gyakorisága a perzisztens CIB és fenilurea vegyületeknek. Így a humán populáció is erős expozícióknak kitett e vegyületek tekintetében (pl. lengyel lakosoknak csak a HCIB-ra vonatkozó napi terhelése $1,4 \mu\text{g/fő/nap}$). Az endokrin rendszert érintő hatások és a kapcsolt kardiovaszkuláris események feltárása tehát a magasan terhelt életerek miatt is indokolt. A kitűzött célok megvalósításához először az *in vivo* expozíciós modell kialakítását és standardizálását végeztem el (1.a. cél), amihez csecsemő

gyomorszondával történő, reprodukálható és pontos dozírozást biztosító kezelési sémát alakítottam ki és vezettem be.

A prolaktinomás adenohipofízist szubkután ösztron-acetát (150 µg/ttg kg/hét 6 hónapon át) implantátum beültetésekkel (1.b. cél) indukáltam. A polaktinoma megjelenését a Wistar ♀ patkányok vérplazma prolaktin (PRL) tartalmának ellenőrzésével (kezeletlen: $2,9925 \pm 0,11$ ng PRL/mg protein; kezelt: $7,3475 \pm 0,07$) követtem. Szignifikánsan megemelkedett plazma PRL tartalom volt detektálható a prolaktinomás egyedeknél, amit az *in vitro* sejt kultúra modellekkel is igazoltam (AdH: $7,13 \pm 0,04$ ng PRL/mg protein, PRLOMA: $17,14 \pm 0,02$ ng PRL/mg protein). A kardiovaszkuláris vonatkozások a PRL nitrogén monoxid-szintáz (NOS)-on és/vagy β_2 receptoron át érvényesülő vazokonstriktív hatásai, valamint az ösztrogének vazotónus szabályozó szerepe révén került bemutatásra, így a kísérleti modellekkel a klinikummal való összefüggések is vizsgálhatók. Ilyen módon az endokrin zavarok kutatásában a PRL elválasztást meghatározó és/vagy ösztrogén receptor (ER) mediált hatások valamint a kardiovaszkuláris csomópontok hálózati kapcsolatát is tanulmányozhattuk. Ugyanis ismert a CIB ágensek ösztrogénmimetikus hatása is, ami tovább támogatta a prolaktinomás ED kutatási modellek alkalmazását. Az ER-k az érszűkület és aneurizma szempontból is jelentősek kettős, vazorelaxáns és vazokonstriktív hatásuk révén. Ebben a vonatkozásban az érrendszeri ösztrogénhatások kulcsszereplője az endotélium és annak integritása, amely meghatározza az ösztrogének vazokonstriktív vagy vazorelaxáns hatásait.

Ugyanakkor a kialakított AdH/PRLOMA modellek azt a célt is megvalósíthatóvá tették, hogy az egészséges és „beteg” (zavart funkciójú) sejtek expozíciókra adott válaszait összehasonlíthassuk. Ezeknek a kísérleti eredményeknek a klinikumban történő alkalmazások során van különös jelentősége. A klórbenzol keverék (mCIB) *in vivo* szubtoxikus expozíciós dózisainak beállításához (1.c. cél) a leletezéseken kívül, a toxicitást jelző májenzimeket (SGOT, SGPT, GGT) határoztuk meg, amelyek a $10 - 1,0 - 0,1$ µg/ttg kg/nap dózisoknál nem mutattak a normál tartománytól eltérő értékeket a kezelési időszakokban (0, 30, 60, 90 nap). Ezzel az expozíciók szubtoxikus jellegét igazoltuk.

Az ED hatások celluláris és organizmus szintű vizsgálataihoz hipofízis szintű endokrin regulációkövetést végeztünk az egészséges és „beteg” adenohipofízis (AdH és PRLOMA) sejt kultúrák *in vitro* szabályozási ciklusmodelljeinek alkalmazásával (2. cél). Először az ACTH release ciklusmodell tanulmányoztuk (2.a. cél) a hipofízis-mellékvesekéreg tengely (HMT) működésben, AVP aktiválás és kortikoszteron (B) gátlás mellett AdH és PRLOMA kultúrákban. Az esszenciális ACTH release AdH esetén több mint négyszeresére fokozódott AVP jelenlétében, amit a B ágens AVP-t megelőző adással kivédett. Ugyanezt a regulációs mintázatot mutatta a PRLOMA is, ami az ACTH esszenciális szerepét alátámasztotta. Klinikai extrapolációs szempontjából is fontos követelménynek tartottam a kutatások során a homeosztázisban nélkülözhetetlen, esszenciális (AVP és ACTH), valamint nem esszenciális, de jelentős regulációs szerepű hormonok (OT és PRL) elválasztásainak tanulmányozását normál és expozíciós környezetben. A mCIB *in vivo* expozíciója után kialakított az *in vitro* AdH modellben mutatott ACTH elválasztás eltérések (2.aa. cél) szignifikáns mértékben, dózis- és időfüggően emelkedtek. Amennyiben a kardiovaszkuláris kapcsolatára koncentrálnunk jelen ED hatás kapcsán, akkor a szívben megtalálható MC₃ receptorok szerepére kell fókuszálnunk. A nevezett receptorokhoz az ACTH hasonló affinitással kapcsolódik, mint a melanokortin, ami az MC₃ és MC₄ receptor agonisták jelenlétében észlelhető szívfrekvenciafokozó és vérnyomás emelő hatás miatt lehet igen

érdekes kapcsolat. Tehát, az ACTH plazmavolumene meghatározó lehet az MC₃ receptormediált folyamatok tekintetében. A CIB hatásra megnövekedett ACTH volumenek ED hatást jeleznek, de az így kiváltott kardiovaszkuláris következményeket további kutatásokkal kell meghatározni.

Az *in vivo* perzisztens szerves szennyező (POP) expozíciómentes adenohipofízisből készült, *in vitro* AdH szabályozási HMt ciklusmodell diklórbenzol (dCIB), PU, MU, DU kezelésekre is szignifikánsan emelkedett ACTH elválasztást mutatott. A fenilurea ágensek Cl-szubsztituált homológ soroknak megfelelően mutatták ACTH release-t fokozó ED hatásukat. Az emelkedett ACTH elválasztási *in vitro* vizsgálati eredmények a koszorúerspazmusokkal való összefüggésvizsgálatok időszerűségét megerősítik. Továbbá a dCIB azonos kísérleti rendszerű hatáskövetésével egyéb POP vegyületek Humán Toxicitási Potenciáljának (HTP) a meghatározására is lehetőség nyílt. A dCIB hatásokra standardizált adatok segítségével a különböző kutatási feltételek mellett született eredmények is összehasonlíthatóvá válnak.

A PRLOMA HMt ciklusmodellben a hatótényezők már az ACTH alaprelease funkciót, valamint a B gátolt állapotot is szignifikáns modulációval érintették, de az AVP aktivált hormonelválasztási folyamatot erősen fokozták. Az AdH kultúrák alap PRL elválasztását nem módosították a mCIB, dCIB, PU, MU, DU ágensek. A PRLOMA modellben az alap PRL release-t minden ágens szignifikánsan emelte. Mindez azért is fontos ED és kardiovaszkuláris kapcsolat, mert a PRL az N-terminális fragmentjének koszorúér relaxáció gátlása simaizomsejteken igazolt. Eredményadatainkból az is lényeges, hogy a PRLOMA esetén nemcsak a PRL elválasztás mértékében, hanem az endokrin reguláció esszenciális (ACTH közvetített) szabályozási folyamatában is zavar generálódhat. Az AdH és PRLOMA modellek sejtszinten igazolták az expozíciókra adott endokrin regulációs válaszok közötti lényeges különbségeket. *In vivo* mCIB kezelések hatására a vérplazma ACTH tartalma szintén szignifikánsan fokozódott az expozíciók időtartamával és dózisaival arányosan (2. ab. cél). Ez az adat, amely organizmus szinten mutatja a mCIB hatást az ACTH relációban, koherens a celluláris komplexitási szinten megjelent adatokkal. *In vivo* mCIB kezelések az adenohipofízis sejtek nem mitokondriális Mg²⁺-függő ATP-áz aktivitásait szignifikánsan emelték dózis- és időfüggő módon. Igen jelentős kapcsolat mutat ez az eredményadat a koszorúerspazmussal, ugyanis a vazokonstriktióban különleges szerepet kap a foszforilált állapotú miozin-könnnyűlánc, amely ATP és Mg²⁺ jelenlétében Mg²⁺-függő ATP-áz funkciót is mutat. Így a mCIB kiváltotta ED hatások esetén jelentős vazokonstriktor tényezőként kell számolnunk az emelkedett Mg²⁺-függő ATP-áz aktivitás kapcsán.

A neurohipofízis (2. b. cél) AVP, OT release regulációját *in vitro* NA és 5-HT aktivált ciklusmodellben vizsgálva az előzetes *in vivo* mCIB kezelések hatására az NH modelleknél modulációt tapasztaltunk az alap AVP elválasztásban, ami a monoamin aktivált esetekben szignifikáns fokozódást mutatott a nagyobb dózisok és/vagy hosszabb expozíciók esetén. Kardiovaszkuláris szempontból a NA a vazospazmust az erek endotél sejtjeinek α_2 , β_1 , β_2 és β_3 adrenerg receptor stimulációján át érinti, ami a NO szintézis támogatásával csökkenti az erek α_1 receptor stimulusra kimutatható vazokonstriktióját. Az 5-HT pedig direkt érendotél vagy közvetett vaszkuláris simaizomsejt hatásokkal vált ki vazokonstriktív mechanizmusokat. E két monoamin, tehát szabályozó regulátorcikluselemként is felfogható (érfal összehúzódás gátlás NA/ aktiválás 5-HT). Az ED hatásvizsgálat során monoamin aktivált AVP és OT release fokozódást detektáltunk, ami egyértelművé teszi, hogy

kardiovaszkuláris szinten ez egy folyamatkaszkádot képviselhet, amely beindulva a monoamin-szint emelkedéssel, kiváltja a lokális koszorúerspazmus eseményeket, majd a közben felszabadult megemelkedett AVP és OT hatása fog dominanciát jelenteni a kardiovaszkuláris események megvalósulása során is. Ebben a relációban az AVP vazokonstriktor hatása erősen fokozódik a releaselt AVP mennyiségének emelkedésével, amit membrán receptoraival mediáltan a $[Ca^{2+}]$ intracelluláris koncentrációjának fokozásával valósít meg az erek simaizom sejtjeiben. Az OT elválasztás bazális szintjeinél és a monoamin aktivált mintáknál is a hosszabb és nagyobb dózisu mCIB kezelés esetén tapasztaltunk szignifikáns OT koncentráció növekedést. Kardiovaszkuláris szempontból az OT protektív szerepű, amit NO szintézis fokozó hatásával tart fenn. Az *in vivo* mCIB kezelések a vérplazma AVP és OT tartalmát dózis és időfüggően fokozták (2.ba. cél). Ez az eredmény mind az AVP, mind az OT esetében harmonizál a celluláris szinten kapott adatokkal. Tehát az AVP és OT elválasztásra gyakorolt celluláris és organizmus szintű ED hatások igazoltá váltak a CIB ágensek esetén, ami a következményes kardiovaszkuláris eseményeket is megalapozottá tette. Továbbá organizmus szinten az *in vivo* mCIB expozíciók szignifikáns mértékben emelték a szorongásos és agressziós, valamint szignifikánsan csökkentették a felfedező aktivitást a modellállatok viselkedési vizsgálataiban. Humán vonatkozásokban ismert, hogy az AVP szorongást és agressziót fokozó, az OT pedig anxiolitikus hatású. Mivel a szorongással járó stressz elemek dominánsak a vazokonstriktióban, így a CIB kiváltotta viselkedést zavaró hatás is erősíti ezen ED vegyületek kardiovaszkuláris vonatkozásait.

A neuroendokrin hatásokat szimuláló modellvizsgálatokban (monoamin aktivált rendszerek, HMT) a CIB ágensek egyértelmű rendszerzavaró hatást mutattak, így ezt neuroendokrin diszruptor (nED) hatásnak tekinthetjük, ami komplexebb az ED hatásnál, mert csomópontjai révén több alrendszer működését harmonizálhatják.

A közvetett ED hatások modellezéséhez az extracelluláris tér ionmillieu-jének $[K^+]$ csökkenését vizsgáltuk a standardizált *in vitro* AdH és PRLOMA modelleken (3. és 3.a. cél). Az AdH modellek hipokalémiás közegben kompenzált módon valósították meg az ACTH és PRL elválasztást, - extrém alacsony $[K^+]$ mellett veszítették el az egészséges sejtek a szabályozott release funkcióikat. A PRLOMA esetén az AdH-tól teljesen eltérő ACTH és PRL release kinetika mintázatokat kaptunk (3.ba. cél), ami az egészséges és „beteg” sejtek expozíciókra kialakított választémechanizmusainak különbözőségét mutatja. A hipokalémia ED hatása melletti kardiovaszkuláris kapcsolata szerint a vaszkuláris simaizomsejtek hiperpolarizációjával relaxációt, depolarizációjával vazokonstikciót okoz. Ezen hatásokban a simaizomsejt membrán K^+ -csatornáinak van döntő szerepe. A hipokalémia, ED, és a kardiovaszkuláris kapcsolhatóság szempontjából jelentőssé vált a hormonrelease eredményeket magyarázó háttérmechanizmusok feltárása. Így került igazolásra, hogy a kapott eredmények hátterében (hipokalémiában ACTH és PRL release kinetikában AdH és PRLOMA modelleknél) apoptotikus folyamatok állnak (3.ba.), amit Bcl-2 immunhisztokémiai metodikákkal igazoltunk. Az apoptotikus események vazokonstriktív hatásúak, ami további összefüggést jelez az ED – nED és kardiovaszkuláris eseményeket érintő CIB és fenilurea ágensek hatásait illetően.

A vizsgált hatótényezők a CIB vegyületek és fenilurea ágensek ED, nED hatásait igazolta a kutatási munka. A hatásért felelős mechanizmusként a reaktív oxigén gyök (ROS) generáláson keresztül aktivált folyamatkaszkádot nevezhetjük meg. Az oxidatív stressz hatású CIB és fenilurea vegyületek gyulladást, apoptózist, több utas NO szintézis

akadályozást, továbbá strukturális zavarokat (endotél degenerációt), hormonregulációs zavarokat, Mg^{2+} -ATP-áz aktivitás növekedési problémákat válthatnak ki, amelyekkel közvetlenül és/vagy közvetve zavarják a kardiovaszkuláris eseményeket.

Az experimentális tapasztalatok alapján a vizsgált ED/nED expozítorok kardiovaszkuláris rendszert érintő lehetséges hatásai közül azokat helyeztem a vizsgálataim fókuszába, amelyek funkcionálisan a vazospazmushoz, vagy strukturálisan aneurizma megjelenéséhez vezetnek (4. cél). Ehhez először a vazospasztikus angina és az aneurizma invazív diagnosztikáját és terápiás lehetőségeit kellett vizsgálnom (4.a. cél).

(4.a./1. cél) Differenciáldiagnosztikai szempontból a funkcionális koszorúéreltérés diagnózisának felállításához szükséges a fixálódott, jelentős érszűkület lehetőségének kizárása. Ezt invazív beavatkozással oldottam meg, amely az ramus descendens anterior (RDA) hemodinamikailag nem jelentős strukturális szűkületét igazolta, ami azonban önmagában tünetokozó nem lehetett. A látott morfológiai kép és a klinikum felvetette a tranziens érszűkület (spazmus) lehetőségét, amelyet a kórelőzményben szereplő dohányzás, mint a specifikus orvos szakmai ajánlások szerinti környezeti tényező erősen támogatott. A szakirodalom szerint ugyanis, a dohányfüst ROS komponensekkel hozzájárul az egyedben az oxidatív stressz kialakulásához. A kísérletes munkáimban alkalmazott expozítorok is ROS képző ágensek voltak. Így számomra tudott volt, hogy a ROS következményesen az endotélben az endoteliális nitrogén-monoxid szintáz (eNOS) gátláson keresztül a NO szintézist akadályozva okoz vazokonstriktiót. A CIB-ok kiváltotta ROS mediált események mellett a CIB-metabolitok jelentős reaktív oxigéngyök képző hatását is ismertem. A szakirodalom hasonló intraorganikus következményeket ír le a dohányzás kapcsán is. Ezek az ismeretek alapozták meg a tranziens vazospazmus gyanúját és a további vizsgálatok indikálását. Egy biztonságos, de a szakmai ajánlásoktól eltérő OCT vizsgálattal feltárásra került az érlumenben lapszerűen elterülő szervült trombus és annak pontos pozíciója. További információt is kaptam a vizsgálatból, miszerint a trombusból disztálisan endotél lacerációkat azonosíthattam. Experimentális tapasztalataim ezt is alátámasztották, ugyanis ha az endotélsejtek találkoznak a dohányzásból származó hatóanyagokkal (vagy ED vegyületekkel), akkor azok különböző faktorokkal (pl. tumor nekrozis faktor /TNF/, IL6, IL-8, IL-10; IL-18, c-reaktív protein /CRP/) mediáltan gyulladást, apoptotikus folyamatokat generálhatnak. Ennek következtében a TNF- α és a mátrix metalloproteáz (MMP) szintek emelkedése okán lokális kollagén és extracelluláris mátrix zavart eredményezhetnek. Tehát az endotél diszstrukturális eltérésének oka ROS aktivált folyamat, ami az RDA lumen felé eső felszínét alkalmassá tette a trombociták kitapadására. A trombusból felszabaduló 5-HT az ér fokális spazmusát erősítette. A funkciójában és strukturálisan károsodott érszakasz sztenttel került áthidalásra a további spazmosos események megelőzése érdekében. Megállapítható, hogy az ED/nED hatóanyagok kiváltotta lehetséges diszfunkciós és diszstrukturális mechanizmusok az érszűkületben domináns szerepűek. Jelen spazmosos eseménynél a reverzibilis fázison túljutott kiszavarral találkozunk, amit az érfal felrostozódása, mint kezdődő strukturális zavar is alátámasztott. Mindez a terápiában fontos támpontot jelentett a sztent pozíciójának megválasztásához.

A bal Valsalva tasakból kiinduló aorta gyöki aneurizmát (4.a./2. cél) non-invazív multi-detektoros CT vizsgálattal tisztáztam. Látható lett a bal koszorúér kezdeti szakaszának az aneurizma által okozott szív ciklussal szinkron, dinamikus, életet veszélyeztető kompressziója. Fontos előzmény volt számomra - kutatói munkám eredményeként -, hogy a beteg dohányzó és közvetlenül jelen panaszai előtt traumás szepszise volt. Tehát

számolnom kellett gyulladásoz folyamatokkal (TNF- α , IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL- 23 és IFN- γ faktorokkal) és fokozott ROS jelenléttel, sőt apoptotikus eseményekkel is. Életveszély okán sebészeti beavatkozás, műbillentyű behelyezés és a komprimált érszakasz áthidalása történt. A műbillentyű implantációnál igazolódott a krónikus gyulladás. A műtét a komprimált érszakasz áthidalása mellett az aneurizma keringésből való kirekesztését célozta. Ennek hosszú távú eredményessége a megelőző krónikus gyulladásoz folyamatok és a dohányzás miatt számomra kétségesnek mutatkozott, amit a kialakult varratelégtelenség és az aneurizma falának folyamatos strukturális degenerációja igazolt is. A multi-detektoros szív CT angiográfiás felvétellel igazolt aneurizma progressziót az aneurizma dinamikus kompresszió fokozódása okozta, ez határozta meg ezután a beteg panaszait. Ezt is morfológiailag angiográfia és intravaszkuláris UH vizsgálattal igazoltam, kimutattam az iszkémiát okozó hatását (FFR vizsgálattal). Az iszkémia kezelésekként a bal koszorúér közös törzsébe sztent került behelyezésre, aminek eredményességét kontroll FFR vizsgálat igazolta. Ugyanezt követően megszűnt a bal közös törzs külső, aneurizma okozta kompressziója és a beteg panaszmentessé vált, az aneurizma azonban továbbra is jelen maradt, ami számomra az ED/nED hatások ismeretében további klinikai események lehetséges megjelenését sugallja.

Az experimentális munka eredményeként vazotónus zavarát okozó hatások vizsgálatához (4.1./b. cél) feltártam, hogy a koszorúérszűkülettel járó betegségek diagnosztikájával és terápiás javaslataival foglalkozó európai-, észak-amerikai- és japán szakmai kollégiumok ajánlásaiban a környezeti tényezők patoetiológiai szerepe alulreprezentált. Ugyan az európai és amerikai ajánlás a dohányzást, droghasználatot, a japán ajánlás a dohányzás mellett az alkohol fogyasztást is megemlíti, de napjaink igazán jelentős környezeti faktorairól nem tesz említést. Pedig a megváltozott környezeti feltételekhez való alkalmazkodás során a korábbiaktól eltérő fiziológiai folyamatok jelennek meg, amelyek eleinte csak biokémiai (pl. zsírsavanyagcsere eltérések), majd funkcionális (pl. érszűkület) zavarokat indukálhatnak. A szervezetben kialakult kis- és strukturális zavarok az orvosi gyakorlat számára egy-egy betegség diagnosztikájának, progressziójának vagy a terápiás megoldások tervezését és végrehajtását is erősen meghatározza. A környezeti terhelések okozta endokrin zavarok esetére vonatkozóan az orvosi ajánlásokban már kibontakozóban van a hatótényezőcsoportok szerinti hatáseredmény megjelenítés. Ennek példájára elengedhetetlenül fontosnak tartom a kardiovaszkuláris környezeti zavaró tényezők hatástényezőinek kezelését is. Így jelen dolgozattal szeretném bevezetni a *Kardiovaszkuláris Disruptor Vegyület* (KvDV) fogalmát, amely alatt azokat a környezeti hatótényezőket értem, amelyek a kardiovaszkuláris betegségcsoportok megjelenésében, fenntartásában napjainkban domináns szerepűek. Jelen munkában a KvDV-k, mint hatótényezők az endokrin disruptor vegyület (EDC) kiváltotta mechanizmusok megismerésén keresztül, mint neuroendokrin és celluláris szabályozási csomópontok kerültek meghatározásra.

ÖSSZEFOGLALÁS – KÖVETKEZTETÉSEK (Az alábbiakban dőlt betűvel jelezve mutatom be a disszertáció új megállapításait.)

1. Kialakításra került a(z)

a, gasztrointesztinális expozíció út modellezése az ED kémiai hatótényezők kutatásához (csecsemő szonda, standard térfogat, testtömeghez iteraltan) Wistar törzű patkány-modellen.

b, állatkísérletesen standardizált prolaktinomás adenohipofízis modell szubkután ösztron-acetát implantációval (6 hónapon keresztül, 150 µg/ttg kg/hét, szubkután beültetés).

c, az expozítorok szubtoxikus dózisainak és kezelési időszávjainak modellezése. Továbbá a celluláris regulációs folyamatkövetésekhez *in vitro* szabályozási ciklus, neurohipofízis (specifikus monoamin aktivált, specifikus antagonistá gátolt AVP, OT release) és adenohipofízis (hipofízis-mellékvesekéreg tengely: kortikoszteron gátlás, AVP ko-aktiválás, kombinált gátlás/aktiválás ACTH release követés) vonatkozásában. (Közl. 1,2,10)

2. Igazolást nyert közvetlen hatásvizsgálatokban az 1,4 para-diklórbenzol, a klórbenzol mix, a fenuron, monuron és diuron hatóanyagok endokrin diszruptor hatása mind a celluláris (exocitotikus aktivitás *in vivo* és/vagy *in vitro* expozíciókra), mind az organizmus (plazma hormonszintek alakulása AVP, OT, ACTH, PRL; viselkedés: szorongás, lokomotoros aktivitás, exploratív funkciók, agresszivitás vizsgálatok) biológiai rendszerszintjén. (Közl. 5,6)

a, Az 1,4 para-diklórbenzol hatáseredményeinek bevezetésével csatlakoztunk a szabványos, nemzetközi adatszolgáltatási lehetőségekhez a Humán Toxicitási Potenciál nED hatóanyagok tekintetében. (Közl. 11)

3. Az *in vitro* regulációs ciklusmodellek segítségével megállapítottam a klórbenzolok neuroendokrin diszruptor hatását, kiterjesztve a korábbi endokrin diszruptor hatásspektrumot (az AVP, OT monoamin aktiváció /NA, 5-HT/és az ACTH elválasztás szabályozás hipofízis-mellékvesekéreg tengely működés hatóanyagok általi szignifikáns zavarásának igazolásával). (Közl. 1,2,6)

4. Igazoltam, hogy az egészséges (AdH) sejtekhez viszonyítva a diszfunkciós (beteg - PRLOMA) sejtek működése eltolt szabályozási ciklusú, amit az ED ágensek tovább erősítenek (dominánsabban jelenik meg az ACTH/PRL regulációs mechanizmusok eltolódása az AdH és a PRLOMA relációiban). Mindez a klinikai gyakorlat szempontjából igen jelentős. (Közl. 1)

5. Bizonyítást nyert az AdH sejtek vonatkozásában, hogy az ED hatóanyagok, a CIB ágensek szignifikánsan fokozzák a nonmitokondriális Mg²⁺-függő ATP-áz aktivitást. (Közl. 1)

6. A közvetett ED hatások modellezésében igazolt, hogy a hipokalémiát - mint a klinikumban gyakran megjelenő (pl. toxicitási) eseményt -, az egészséges AdH sejtek jellegzetes kompenzációval (alkalmazkodási potenciállal) kezelik (dózis és hatásidőszá tekintetében az ACTH és PRL release során). Ezt a diszfunkciós PRLOMA sejtek sem az ACTH, sem a PRL elválasztás tekintetében nem mutatják. A klinikum számára ez újabb bizonyíték az egészséges és beteg sejtfunkciók közötti szignifikáns eltérésekre.

a, A hipokalémiás protokollokban észlelt dekompenzált sejtfunkciók hátterének immunhisztokémiai vizsgálattal bizonyított magyarázata az apoptotikus folyamatok zajlása. (Közl. 1)

7. Kísérletesen igazolást nyert, a CIB hatóanyagokra, mint lipofil xenobiális modellvegyületekre vonatkozóan, hogy azok hatáseredményei valóban dózis és időfüggően jelennek meg. Így ezekre csak intraorganizmus szintű küszöbököt lehet meghatározni a HTP vizsgálatok során (jelenleg a törvényi szabályozásban terhelési határértékeket adnak meg). (Közl. 2,5,6)

8. Meghatározásra kerültek az ED/nED ágensek - stratégiai célokként kezelt azon -, háttérmechanizmusainak szakirodalmi feltárásai, amelyek révén kapcsolat mutatható ki a kardiovaszkuláris események vazotónust és aneurizmát meghatározó folyamatai között. Így a CIB és fenilurea vegyületek oxidatív stresszt kiváltó hatásainak mechanizmusát hozhattam összefüggésbe a vazokonstriktiót vagy aneurizmát kiváltó generális celluláris mechanizmusokkal. (Közl. 3,4)

a, A ROS hatást kiváltó fenilurea és CIB vegyületek és metabolitjaik ED tulajdonságaik, komplex módon hatnak a NO/eNOS rendszerre, amivel a vazokonstriktiót erősítik.

b, A ROS mechanizmus közvetlen gyulladáshoz vezető citokin expressziót fokozva destruálhatja az érendotélt, amivel a MMP működésén át gyengíti az érfalstruktúrát aneurizmák kialakulásának kedvezve.

c, A ROS hatáson keresztül fokozni képes a CRP mennyiségét, ami a vazokonstriktív válaszokat erősíti.

d, A ROS mechanizmussal a vaszkuláris simaizomsejt miozin könnyű láncának Mg^{2+} -függő ATP-áz aktivitását fokozva (az előzetes miozin könnyű lánc foszfatáz, RhoA/Rho-kináz /ROCK/ és diacylglycerol /DAG/ gátlásán át) erősíti a heveny vazokonstriktió kialakulást.

e, A ROS mediált apoptotikus folyamatok az aneurizma kialakulásában játszanak fontos szerepet.

9. A neuro-endokrin szabályozási csomópontok organizmus szintű ED hatás feltárása során megállapítottam, hogy a(z)

a, AVP erős vazokonstriktív tényező, amely a többutas intracelluláris Ca^{2+} -szignalizáción keresztül fokozza ezt a hatását. Az OT vazoprotektív szerepű. Ezt a két kardiovaszkulárisan ellentétes hatást képviselő hormon mennyiségét a vizsgált EDC szignifikánsan fokozzák. A hatásdominanciát mégis az AVP képviselte, amit a viselkedési vizsgálatok igazoltak. (Közl. 3,4,5)

b, monoaminok (NA és 5-HT) által szabályozott AVP elválasztás zavara mellett a monoamin ágensek önálló kardiovaszkuláris szerepét is hangsúlyosan kell kezelni. Ugyanis a viselkedésmintázatok megváltoztatásával, a szorongásfokozással (humán vonatkozásban a mentális stressz növelésével) hozzájárul a vazospasmus, vagy aneurizmák kialakulásához. (Közl. 3,4,6)

c, ACTH lehetséges kardiovaszkuláris szerepét további vizsgálatokkal kell tisztáznunk. (Közl. 3,4,2)

d, PRL erős vazokonstriktor tulajdonságú az N-terminális fragmentjén keresztül koszorúér relaxációt gátló hatása, valamint a NOS és β -adrenerg aktiváció révén kialakuló vazokonstriktív hatása révén. (Közl. 1,3,4)

e, ösztrogének ER-en keresztül a magban és a membránban fejtik ki hatásukat, amelyek kettős, vazodilatációs és/vagy vazokonstriktor jellegűek. Az érendotél membrán ER aktivációján keresztül a vazokonstriktor szerep erősödik.

Következésképpen megállapítható, hogy az ED/nED hatótényező klórbenzol és uron vegyületek Kardiovaszkuláris Disruptor (KvD) támadáspontúak celluláris és organizmus szinten.

10. Az európai (ESC), amerikai (AHA) és japán (JCS) kardiovaszkuláris szakmai ajánlások az koszorúérszűkület vonatkozásában a dohányzáson, drogokon és alkohol fogyasztáson kívül egyéb környezeti tényezők szerepét nem említik. Ugyanakkor rávilágítottam arra, hogy

a 21. századra már megváltozott környezeti feltételek nagy valószínűséggel döntő szerepűek a bemutatott betegségek megjelenésében. (Közl. 1-6)

11. Az EDC kiváltotta hatások révén igazoltam azok kardiovaszkuláris betegségek kialakulásában betöltött jelentőségét, ami megalapozza, hogy ezen ágensek **Kardiovaszkuláris Disruptor Vegyületekként is értelmezhetők.**

ÖSSZEGZÉS

A CIB-ok, fenilurea ágensek expozícióinak következtében módosulnak az evolúciósan rögzült fiziológiai folyamatok. Humán esetben sok ritka és fokozott gyakoriságú ismert betegséget okozhatnak, háttérükben sokszor ED funkciókkal. Jelen munka célja a CIB-ok és fenilurea hatóanyagok ED vizsgálata celluláris és organizmus szintű standardizált modellek kialakításával; továbbá az ED és kardiovaszkuláris közös csomópontok feltárása után a vazokonstriktív, aneurizmával való lehetséges összefüggések bemutatása. A hatóanyagok szubtoxikus *in vivo* (mCIB: 0,1-10 µg/ttg kg/nap), *in vitro* (dCIB, mCIB, PU, MU, DU 0,1-10 µg/minta) dózisaival kezelt (táplálkozási útvonalon és NH, AdH, PRL-OMA sejtkultúra) kutatási modellekben AVP, OT, ACTH, PRL release-t (RIA, LIA), a Mg²⁺-függő ATP-áz aktivitást (módosított Martyn-Dotty), prolaktinoma modellt (150/µg/ttg kg/hét 6/hó ösztrogén-acetát implantáció), immunhisztokémiai hormontartalom és/vagy apoptotikus funkciót követést vizsgáltunk. Endokrin ciklusmodellben: NA, 5-HT aktivált AVP, OT és HMT működésben ACTH, PRL elválasztást tanulmányoztunk. Detektáltunk viselkedéselemeket OF, EPM, RI módszerekkel. Klinikai vizsgálatokban invazív beavatkozásokkal vazokonstriktív és aneurizmát diagnosztizáltunk, kezeltünk. Adatainkat SPSS 13.0 for Windows; ANOVA és Fisher-féle LSD post hoc eljárással; Kruskal-Wallis nem-paraméteres-; Mann-Whitney U-tesztel; SAS 9.2 software-vel elemeztük. Eredményeinkkel igazoltuk: mCIB, dCIB, PU, MU, DU ágensek ED és nED hatásait; CIB ágensek erős szorongás- és agresszió-fokozó, valamint exploratív viselkedést csökkentő hatását; hipokalémiára kialakuló egészséges és beteg sejtválaszok szignifikáns különbségét és apoptotikus háttérmechanizmusait. A kísérletes munkák támogatták a klinikumban a vazokonstriktív és az aneurizma pontos diagnózisát és hatékony kezelését. Feltáráshoz kerültek azon celluláris (ROS, gyulladás, ROCK, hipoionia) és organizmus szintű (mentális stressz állapotok: szorongás, agresszió, ED/nED szabályozás: AVP, OT, ACTH, PRL, NA, 5-HT, ösztrogének) csomópontok, melyeken keresztül a CIB és fenilurea ágensek potenciálisan KvD hatást válthatnak ki.

SUMMARY

Exposures to CIB and phenylurea agents modify the evolutionarily fixed physiological processes. In humans, many rare and common known diseases can be caused by these agents through ED mechanisms. The aim of this present work is to investigate the ED effects of CIB and phenylurea agents in standardized cellular and organism-level models; to explore the possible linkage between ED effects and cardiovascular events; and to demonstrate possible relationships with vasoconstriction and aneurysm formation. In research models treated with *in vivo* (mCIB: 0.1-10 µg /bw kg / day), and *in vitro* (dCIB, mCIB, PU, MU, DU 0.1-10 µg / sample) subtoxic doses of expositors (via dietary route, using NH, AdH, PRL-OMA cell culture models) AVP, OT, ACTH, PRL release (RIA, LIA), Mg²⁺-dependent ATPase activity (modified Martin-Dotty), prolactinoma model (induced by 150 / µg bw kg /week 6/ month estrone-acetate implantation), immunohistochemical hormone content and/or apoptotic function was monitored. In endocrine cycle-model: NA, 5-HT activated

AVP, OT and in hypophyseal-adrenal axis: ACTH, PRL secretion was studied. Behavioral elements were detected by OF, EPM, RI tests. In clinical research coronary spasm and aneurysm were investigated and treated with invasive and non-invasive methods. Data were analyzed by SPSS 13.0 for Windows; ANOVA and Fisher's test; Kruskal-Wallis non-parametric- and Mann-Whitney U-test with SAS 9.2 software. Our results confirmed the ED and nED effects of mCIB, dCIB, PU, MU and DU agents; the enhancement of anxiety and aggression as well as reduction of exploratory behavior induced by CIB agents; and the significant differences in cellular responses and apoptotic mechanisms induced by hypokalemia in healthy and diseased cellular systems. Our experimental work supports the understanding of the underlying pathomechanisms of clinically detected coronary spasms and aneurysms which will help their recognition and effective management in the future. Target mechanisms in cellular- (ROS, inflammation, ROCK, hypoionia) and organism-level (mental stress states: anxiety, aggression, ED / nED regulation: AVP, OT, ACTH, PRL, NA, 5-HT, estrogens) were explored through which CIB and phenylurea agents may exert Cardiovascular Disruptor effects.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet szeretném kifejezni az SZTE Dr. Juhász Anna Környezettoxikológiai Kutató Műhely (Reg No: MU 69265069 0001; Assessment Report No: 28246596 003) munkatársainak, különösen Dr. Habil. Gálfi Márta és Dr. Sepp Krisztián témavezetőimnek az inspiráló közös munkákért és a folyamatos támogatásért. Köszönettel tartozom továbbá Dr. Ungi Imre egyetemi docensnek, aki az orvos-szakmai munkámban nyújtott pótolhatatlan segítséget. Köszönettel tartozom Családomnak, akik kutatási feladataim során mindenben támogattak a nyugodt családi háttér megteremtésével. Köszönettel tartozom az EFOP-3.4.3-16-2016-00014, és az EFOP-3.6.1-16-2016-00008 projekt támogatásokért!

TÁRSSZERZŐI LEMONDÓ NYILATKOZAT

Alulírott *Dr. Nagyéri György Ph.D.*, mint elsőszerező, nyilatkozom az alább feltüntetett publikációval kapcsolatban,

Nagyéri, G; Valkusz, Z; Radacs, M; Ocsko, T; Hausinger, P; Laszlo, M; Laszlo, FA; Juhasz, A; Julesz, J; Galfi, M: Behavioral and endocrine effects of chronic exposure to low doses of chlorobenzenes in Wistar rats *NEUROTOXICOLOGY AND TERATOLOGY* 34: 1 pp. 9-19., 11 p. (2012)

hogy dr. Hausinger Péter „**Környezeti hatóanyagok endokrin diszruptor (ED) hatásainak experimentális vizsgálata és kapcsolatai a kardiovaszkuláris klinikai gyakorlattal**” című Ph.D. értekezésének megjelölt tézispontjaiban megfogalmazott állításokat, amelyek a fenti közös tudományos publikációnkon is alapulnak, jelölt önálló tudományos eredményeinek ismerem el. Tézispontokhoz: 2; 7; 9a; 10; kapcsolt közös publikációnk sorszáma a téziszüzetben: 5. Egyúttal lemondok arról, hogy doktori vagy más tudományos minősítő eljárásban ezen eredményösszefüggéseket felhasználjam.



elsőszerezői aláírás: Dr. Nagyéri György

Szeged, 2021. 08. 23.

TÁRSSZERZŐI LEMONDÓ NYILATKOZAT

Alulírott *Dr. Molnár Zsolt Ph.D.* mint elsőszerező, az alább feltüntetett cikkekre/ egyéb közleményekre vonatkozóan nyilatkozom arról,

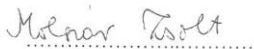
Molnar, Z; Palföldi, R; Laszlo, A; Radacs, M; Sepp, K; Hausinger, P; Tiszlavicz, L; Valkusz, Z; Galfi, M: Effects of chronic and subtoxic chlorobenzenes on adrenocorticotrophic hormone release JOURNAL OF ENVIRONMENTAL SCIENCES 34 pp. 165-170., 6 p. (2015)

Molnar, Z; Palföldi, R; Laszlo, A; Radacs, M; Laszlo, M; Hausinger, P; Tiszlavicz, L; Razga, Z; Valkusz, Z; Galfi, M: The Effects of Hypokalaemia on the Hormone Exocytosis in Adenohypophysis and Prolactinoma Cell Culture Model Systems EXPERIMENTAL AND CLINICAL ENDOCRINOLOGY & DIABETES 122: 10 pp. 575-581., 7 p. (2014)

Zsolt Molnár, Péter Hausinger, Marianna Radács, Anna László, Márta László, Zsuzsanna Valkusz, Regina Pálföldi, Krisztián Sepp and Márta Gálfí: Investigation of the effect of sugar replacement compounds on adrenaline-activated AVP secretion. 34th ECNP Congress, Lisbon, Portugal, poster number: P.1059 (2021), 1 p.

Zsolt Molnár, Péter Hausinger, Krisztián Sepp, Marianna Radács, Anna László, Márta László, Andrea Csikós, Regina Pálföldi and Márta Gálfí: The connection between serotonin activated arginine-vasopressin release regulation and sugar substitutes. 33rd ECNP Congress *Virtual*, <https://www.ecnp.eu/about-ecnp/history/past-ecnp-meetings/past-congresses/virtual-2020>,

hogy dr. Hausinger Péter „**Környezeti hatótényezők endokrin diszruptor (ED) hatásainak experimentális vizsgálata és kapcsolatai a kardiovaszkuláris klinikai gyakorlattal**” című Ph.D. értekezésének alábbi tézispontjaiban megfogalmazott állításokat, amelyek közös tudományos publikációinkon is alapulnak, a jelölt önálló tudományos eredményeinek ismerem el. Tézispontokhoz: 1, 3, 4, 6, 7, 10 kaptam közös publikációink sorszáma a téziszűzetben: 1,2,10. Egyúttal lemondok arról, hogy doktori vagy más tudományos minősítő eljárásban ezen eredményösszefüggéseket felhasználjam.



elsőszerezői aláírás: Dr. Molnár Zsolt

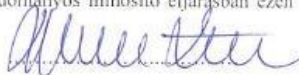
Szeged, 2021. augusztus. 30.

TÁRSSZERZŐI LEMONDÓ NYILATKOZAT

Alulírott *Dr. Valkusz Zsuzsanna Ph.D.* mint elsőszerező nyilatkozom az alább feltüntetett publikációval kapcsolatban,

Valkusz, Z.; Nagyeri, G.; Radacs, M.; Ocsko, T.; Hausinger, P.; Laszlo, M.; Laszlo, FA; Juhasz, A.; Julesz, J.; Palföldi, R et al.: Further analysis of behavioral and endocrine consequences of chronic exposure of male Wistar rats to subtoxic doses of endocrine disruptor chlorobenzenes *PHYSIOLOGY & BEHAVIOR* 103: 5 pp. 421-430., 10 p. (2011).

hogy dr. Hausinger Péter „**Környezeti hatótényezők endokrin diszruptor (ED) hatásainak experimentális vizsgálata és kapcsolatai a kardiovaszkuláris klinikai gyakorlattal**” című Ph.D. értekezésének megjelölt tézispontjaiban megfogalmazott állításokat, amelyek közös tudományos publikációkon is alapulnak, jelölt önálló tudományos eredményeinek ismerem el. A tézispontokhoz: 2; 3; 7; 9b; 10; kapsolt közös publikációink sorszáma a tézisfüzetben: 6. Egyúttal lemondok arról, hogy doktori vagy más tudományos minősítő eljárásban ezen eredményösszefüggéseket felhasználjam.



elsőszerezői aláírás: Dr. Valkusz Zsuzsanna

Szeged, 2021. 08. 23.

TÁRSSZERZŐI LEMONDÓ NYILATKOZAT

Alulírott az alább feltüntetett cikke vonatkozóan nyilatkozom arról,

Radacs, M.; Molnár, Z.; Sepp, K.; Hausinger, P.; Racz, L.; Valkusz, Zs.; Balla, Z.; Gálfi, M.: The role of endocrine disrupting compounds effects in endocrine network diseases. *Obesity Facts* 11. Suppl. 1p. 210 (2018)

hogy dr. Hausinger Péter „**Környezeti hatótényezők endokrin diszruptor (ED) hatásainak experimentális vizsgálata és kapcsolata a kardiovaszkuláris klinikai gyakorlattal**” című Ph.D. értekezésének tézispontjaiban megfogalmazott egyes állítások közös tudományos publikációinkon is alapulnak, amelyeket a jelölt önálló tudományos eredményeinek ismerem el. Egyúttal lemondok arról, hogy doktori vagy más tudományos minősítő eljárásban ezen eredményösszefüggéseket felhasználjam.



Dr. Habil Radacs Marianna

Szeged, 2021. augusztus. 25.

TÁRSSZERZŐI LEMONDÓ NYILATKOZAT

Alulírottak az alább feltüntetett cikkekre vonatkozóan nyilatkozunk arról,

Ildikó, Trója; István, Varga; Anna, Gutási; Péter, Hausinger; Zsolt, Molnár; Andrea, Serester; Márta, Gálfi; Marianna, Radács: Remodelling of LCA compatible environmental loading. In: Alapi, Tünde; Ilisz, István (szerk.) Proceedings of the 25th International Symposium on Analytical and Environmental Problems Szeged, Hungary, University of Szeged, (2019) 464 p. pp.: 418-420., 3p.

István Varga, Zsolt Molnár, Anna Gutási, Ildikó Trója, Péter Hausinger, Marianna Radács, Márta Gálfi: The investigation of sugar substitute compounds on neuroendocrine functions – in environmental loading model . In: Alapi, Tünde; Ilisz, István (szerk.) Proceedings of the 25th International Symposium on Analytical and Environmental Problems (2019) 464p. pp.421-423pp. 3p.

hogy dr. Hausinger Péter „**Környezeti hatótényezők endokrin diszruptor (ED) hatásainak experimentális vizsgálata és kapcsolata a kardiovaszkuláris klinikai gyakorlattal**” című Ph.D. értekezésének tézispontjaiban megfogalmazott egyes állítások közös tudományos publikációinkon is alapulnak, amelyeket a jelölt önálló tudományos eredményeinek ismerünk el. Egyúttal lemondunk arról, hogy doktori vagy más tudományos minősítő eljárásban ezen eredményösszefüggéseket felhasználjuk.

Témavezetői nyilatkozat

Trója Ildikó, Varga István, hallgatók témavezetőjeként nyilatkozom, hogy a fenti állítások a valóságnak megfelelnek és hogy doktori vagy más tudományos minősítő eljárásban ezen eredményösszefüggéseket fel nem használják.



.....
Dr. Gálfi Márta témavezető

Szeged, 2021. augusztus. 25.