

**AZ ENDOKRIN DISZRUPTOR HATÁSOK VIZSGÁLATA NEUROENDOKRIN
RENDSZEREKBEN, *IN VIVO* ÉS *IN VITRO***

dr. Sepp Krisztián

Ph.D. értekezés tézisei

Témavezető: Dr. Valkusz Zsuzsanna, Ph.D.

Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola

Szegedi Tudományegyetem

2019

A téziseket megalapozó publikációk

2.1. a,

I. K. Sepp, M. Nagy oh., É. Csajbók, S. Magony, Zs. Valkusz, T. Wittmann: Incidence of second primary tumors in patients with differentiated thyroid carcinoma. / Második primer tumor előfordulása differenciált pajzsmirigy karcinómás betegekben. Magyar belorvosi Archívum 66. évf. 2: 87-93. (2013)

II. K. Sepp, A. Serester, Zs. Molnár, M. Radács, Zs. Valkusz, M. Gálfi: Environmental effect on thyroid dysfunction. In: Tünde, Alapi; István, Ilisz (szerk.) Proceedings of the 24th International Symposium on Analytical and Environmental Problems. Szeged, Magyarország: Szegedi Tudományegyetem, pp. 397-401. 5 p. (2018)

2.1.b,

III. K. Sepp, A. László; M. Radács; A. Serester; Zs. Valkusz; M. Gálfi; Zs. Molnár: The Hormone Exocytosis in Prolactinoma and Normal Adenohypophysis Cell Cultures by the Effects of Hypocalcaemia. Cell and developmental biology 6: 1 paper: 1000182, 7 p. (2017)

2.2.a,

IV. Zs. Molnar; R. Palfoldi; A. Laszlo; M. Radacs; K. Sepp; P. Hausinger; L. Tiszlavicz; Zs. Valkusz; M. Galfi: Effects of chronic and subtoxic chlorobenzenes on adrenocorticotrophic hormone release. Journal of Environmental Sciences 34 pp. 165-170. 6 p. (2015)

(III). Sepp, K; László, A; Radács, M; Serester, A; Valkusz, Z; Gálfi, M; Molnár, Z: The Hormone Exocytosis in Prolactinoma and Normal Adenohypophysis Cell Cultures by the Effects of Hypocalcaemia. Cell and Developmental Biology 6: 1 Paper: 1000182, 7 p. (2017)

V. Sepp K, Laszlo AM, Molnar Z, Serester A, Alapi T, Galfi M, Valkusz Z, Radacs M: The Role of Uron and Chlorobenzene Derivatives, as Potential Endocrine Disrupting Compounds, in the Secretion of ACTH and PRL. International Journal of Endocrinology 2018 Paper: 7493418. (2018)

VI. K. Sepp; Zs. Molnár; A.M. László; T. Alapi; L. Tóth; A. Serester; Zs. Valkusz; M. Radács: Study of the Potential Endocrine-Disrupting Effects of Phenylurea Compounds on Neurohypophysis Cells In Vitro. International Journal of Endocrinology 2019 Paper: 1546131, 9 p. (2019)

2.2.b,

VII. A.M. Laszlo; M. Ladanyi; K. Boda; J. Csicsman; F. Bari; A. Serester; Z. Molnar; K. Sepp; M. Galfi; M. Radacs: Effects of extremely low frequency electromagnetic fields on turkeys. Poultry Science 97: 2 pp. 634-642. 9 p. (2018)

Rövidítések jegyzéke:

A: adrenalin	EMF: elektromágneses tér
ACTH: adrenokortikotrop hormon	ETA: European Thyroid Association (Európai Pajzsmirigy Társaság)
AdH: adenohipophysis	HA: hisztamin
anti-TG: anti-thyreoglobulin antitest	5-HT: szerotonin
anti-TPO: anti-thyreoidea peroxidáz antitest	LIA: luminescens immunoassay
AVP: 8-arginin vazopresszin	mCIB: klórbenzol mix (hexaklórbenzol+1,2,4-triklórbenzol=1:1)
ATA: American Thyroid Association (Amerikai Pajzsmirigy Társaság)	MU: monuron
ATP-áz: adenzin-trifoszfátáz enzim	NA: noradrenalin
B: kortikoszteron	NH: neurohipophysis
cAMP: 3'-5'-ciklikus- adenzin- monofoszfát	OT: oxitocin
CIB: klórbenzol	PU: fenuron
dCIB: 1,4-diklórbenzol	PRL: prolaktin
DA: dopamin	PRLOMA: prolaktinomás adenohipophysis
DU: diuron	RIA: radioimmunoassay
ED: endokrin diszruptorok	TSH: thyreoidea-stimuláló hormon
EDC: endokrin diszruptor vegyületek	tts. kg: testsúly kilogramm
ELF-EMF: extrém alacsony frekvenciájú és dózisú elektromágneses tér	

Endokrin diszruptor hatások vizsgálata neuroendokrin rendszerekben *in vivo* és *in vitro*

A környezeti terhelések (fizikai, kémiai, biológiai) hatásai zavarják a humán homeosztatikuss pszicho-neuroendokrin-immun mechanizmusokat. A kiváltott hatások és hatótényezők szerepének tisztázása a 21. századra akut feladattá vált. Jelen munkában célként a kémiai (aromás/halogénezett szénhidrogének) és fizikai (extrém alacsony frekvenciájú és dózisé elektromágneses tér: ELF-EMF) környezet-terhelések hatásainak vizsgálatát, azok endokrin diszruptor (ED) szerepének meghatározását jelöltük meg. Továbbá vizsgáltuk a nevezett hatótényezők szerepét a sejt- és egyedszintű expozíciókban, a kiváltott mechanizmusok tisztázásának érdekében. Különösen fontosnak tartottuk a közvetett és közvetlen hatások kapcsolatainak tanulmányozását az endokrin szabályozási zavarokhoz köthető sejtranszformációs eseményekben.

Munkánk során *in vivo* (Wistar patkányok klórbenzol kezelései gyomorszondán át; Wistar ♀ patkányok kezelése subcutan ösztrogén implantációval; pulykák ELF-EMF kezelése) és *in vitro* (neurohypophysis, adenohypophysis egyrétegű sejt kultúra) expozíciós modelleket alakítottunk ki és standardizáltunk általános viabilitási és/vagy specifikus funkcionális attraktorok (mechanizmus ciklusok) szerint.

A vizsgált kémiai hatótényezők: klórbenzol mix (mCIB): hexaklórbenzol: 1,2,4-triklórbenzol=1:1; 1,4-diklórbenzol (dCIB); fenuron (PU), monuron (MU) valamint diuron (DU) voltak. Ezek ED hatásait vizsgáltuk dózis és időfüggésben. Megállapítottuk, hogy az említett ágensek ED hatásúak az OT, AVP, ACTH és PRL release vonatkozásában. Kutatásainkkal meghatároztuk továbbá a vizsgált kémiai expozíciókban a dCIB-ra vonatkoztatott Humántoxicitási Potenciál (HTP) értékeket. Igazoltuk, hogy az ELF-EMF sejt szintű ED hatást fejt ki, a szabályozási mechanizmusokban érintett sejtmembrán receptorok (G-proteinek) funkcióinak módosítása révén. ED-hatás szimulálásával, pozitív feed-back endokrin szabályozási zavart hoztunk létre és ezzel prolaktinomás adenohypophysis (PRLOMA) modellt alakítottunk ki. Kísérletesen igazoltuk, hogy az így transzformált adenohypophysis funkcionális zavarása ED ágensekkel a normál adenohypophysis sejtekhez viszonyítva sokszor kompenzálhatatlan eseménysorozatot indít el. *In vitro* kutatási eredményeink alapján az orvosi gyakorlatban kimutatott pajzsmirigy sejtranszformációs zavarok háttérben is vizsgáltuk ezután az ED hatások szerepét. Összefüggést tapasztaltunk az ED expozíciók, az anti-TG és anti-TPO markerelt pajzsmirigy malignus tumorok között. Kutatási eredményeink szerint ED tényezőnek tekinthető a mCIB, a PU, MU, DU és az ELF-EMF. Továbbá bizonyítottuk, hogy krónikus endokrin szabályozási zavarral sejtranszformációt idézhetünk elő, amelynek célsejtjei eltérően viselkednek regulációjukban az egészséges sejtekhez képest. Kapcsolatot találtunk a valós pajzsmirigy sejtranszformációk (malignus tumorok) és az anti-TG, anti-TPO markerek jelenlétében igazolt malignitás, valamint az ED tényezők anamnesztikus jelenléte között.

1. Bevezetés

Azon tényezőket, amelyek az endokrinium zavarását keltik, endokrin diszruptoroknak (ED) nevezzük. Ilyen ED tényezők lehetnek a környezeti terhelések: a talaj, levegő, víz, élelmiszerek, stb. Az ED hatáselemzések során vizsgáljuk azok ható-idejét, -mennyiségét, kumulatív kockázatát a szociális, gazdasági, földrajzi, foglalkozási, genetikai és egészségügyi faktorok vonatkozásában.

A sejtszintű ED hatások szerteágazóak, pl. a specifikus receptor és hormon kapcsolódásának fiziológiai alapjait, mint külső környezeti tényező(k) zavarják. A nevezett zavaró hatásokat tipizálva, a következő mechanizmus utakat különíthetjük el, mint az ED hatások mediálásában szerepet játszó tényezőket:

- az ED ágens kapcsolódhat a receptorhoz, ami zavarja a normál szignál transzdukciót (pl. térben, időben), ezáltal atípusos válaszreakciót vált ki. Hasonló eredményeket okozhat az elektromágneses tér (EMF), mint hatótényező is.
- a hatótényezők (kemikália, EMF) a receptorral kooperálva aktivitást nem váltanak ki, viszont gátolják a fiziológiás hormonkapcsolódást, ami következményesen a regulált endokrin választ akadályozza;
- a transzportfehérjék funkcióját (ED, EMF hatásokkal) zavarva a specifikus hormonok transzportját módosítják.
- a hormonszintézis enzimmérszletét - struktúrálisan és funkcionálisan - zavarhatják az ED tényezők (pl. specifikus hormonok kötődését és/vagy biokémiai átalakítását).
- az ED hatások megzavarhatják a hormonok specifikus receptorainak expresszáladását.

A vázolt mechanizmusok kóroki szerepet játszhatnak az obesitas, diabetes mellitus, cardiovascularis betegségek, a férfi és női reprodukciós eltérések, a hormonérzékeny daganatok (nők: emlő, ovarium, endometrium; férfiak: prostata), pajzsmirigy betegségek, idegrendszeri fejlődési eltérések kialakulásában, valamint még nem tisztázott egyéb ED hatásként.

2. Célkitűzés

Az endokrin rendszer zavarása, amely valójában a pszicho-neuro-endokrin-immunrendszer komplex egységét érinti, sok betegség kialakulásában játszhat szerepet. Így a társadalom által biztosított életterekben a megváltozott környezeti feltételek tanulmányozása és az adott expozíciókra következményesen megjelenő egészségügyi problémák közötti összefüggések feltárása hozzásegíthet bennünket bizonyos szisztémás betegségek kórokaainak, patomechanizmusainak feltárásához, amelyek a preventív megoldások kialakítását is sugalmazhatják.

2.1.

Az utóbbi fél évszázad endokrinológiai betegségeinél igen nagy gyakorisággal jelentek meg azok a sejtranszformációs zavarok, amelyek az endokrin mirigyekben, különösen a pajzsmirigyben és a hypophysisben okoztak funkcionális eltéréseket. A pajzsmirigy és

hypophysis sejtszaporulatával járó betegségek esetén tehát, jelentős egészségügyi és terápiás kérdés, hogy a kóroki tényezőkkel összefüggésben is érdemes-e vizsgálni ebből a szempontból a benignus és malignus hypophysis és pajzsmirigy betegségeket.

a, - Jelen munkában egyik fő kérdéskörünk volt, hogy lehet-e ED kiváltotta ok a pajzsmirigy szövet transzformációs zavarai, folyamatai? Ehhez a betegség felismerése, diagnosztikai tipizálása, és az anamnesztikus kapcsolatok feltárása vált szükségessé.

b, - Az ED hatások endokrin szabályozási zavarokat generálva előidézhetnek-e hypophysis sejtranszformációs zavart?

2.2.

A neuroendokrin szabályozásban szerepet játszó aktív hormonok exocitotikus úton történő véráramba jutása alapvető feltétele az egészséges homeosztázis fenntartásának, amelynek zavara jelentős kóroki tényező.

Felmerül a kérdés, hogy az adenohipophysisben és annak sejtranszformációs zavarában a hormonelválasztások ED hatásokra megváltoznak-e? Amennyiben ED hatásokat detektálunk, azok milyen neuroendokrin betegségekben játszhatnak szerepet? Környezet-egészségügyi szempontból jelentős lehet-e, a patomechanizmusok ilyen jellegű ok-okozati tényezőinek feltárása?

a, - Az agráriumban alkalmazott uron (fenuron: PU), és halogénezett szénhidrogén /klórbenzolok (CIB); monuron: MU, diuron: DU/ vegyületek szerepének tisztázása ED hatások szempontjából került vizsgálataink fókuszába. Az említett vegyületek folyamatos környezeti expozíciót képviselnek, melyek nemcsak az ipari - és agrártevékenységek, hanem a tápláléklánc terhelés révén is fontos környezet-egészségügyi szerepűek lehetnek, amennyiben érinthetik pl. az adrenokortikotrop hormon (ACTH), prolaktin (PRL), oxitocin (OT), 8- arginin vazopresszin (AVP) release funkciókat.

b, - Az EMF sejtmembránt érintő hatásaiban az ED hatótényezőként való EMF szerep kutatását a membrán-receptorokon kifejtett hatás alapján kívántuk vizsgálni. Kérdéses volt számunkra, hogy a neuroendokrin szabályozásban jelentős monoamin-receptorok funkcióit képes-e az EMF módosítani? Ezáltal az adott receptor-funkcióhoz kapcsolt hormon-elválasztási regulációs kört (attraktor) vizsgálva új kutatási modell kialakítását is céloztuk.

3. Módszerek

A, Humán vizsgálatok

Betegcsoportok kiválasztása

Pajzsmirigy carcinoma vizsgálatot 341 betegen végeztünk, ebből 78% nő /átlagéletkor: 58 év (20-87 év)/és 22% férfi /átlagéletkor: 56 év (26-89 év)/ volt. A hisztológiai leletek szerint a pajzsmirigy carcinomák 188 papilláris (55%; ♀, ♂ esetén is: 56 év); 58 follikuláris (17%; ♀ esetén: 62 év, ♂ esetén: 69 év); 35 papillo-follikuláris (10%); 27 medulláris (8%; ♀ esetén: 54 év, ♂ esetén: 52 év); 18 ismeretlen szövettani besorolású (5%); 9 Hürthle sejtes (3%); 6 anaplasztikus (2%; ♀ esetén: 74 év, ♂ esetén: 64 év) megoszlást mutattak. A nevezett pajzsmirigy carcinomák besorolását az Európai Pajzsmirigy Társaság (ETA) és az Amerikai Pajzsmirigy Társaság (ATA) ajánlása szerint tettük meg. Az ED experimentális kísérletek eredményei ismeretében a fentiekből bevontunk 35 páciens (pilot study-ként), akiknél a thyreoidea-stimuláló hormon (TSH) érték mellett az anti-thyreoidea peroxidáz antitest (anti-TPO) és/vagy anti-thyreoglobulin antitest (anti-TG) faktorok adatai is rendelkezésre álltak. A vizsgálati protokollt itt kiegészítettük a környezeti ED expozíciók (foglalkozási, munkahelyi, lakókörnyezeti, elektromos készülékek lakáson belüli és kívüli, műanyagok és egyéb kémiai ágensek –agráriumból iparból, háztartási, stb.- hatásokat illetően) feltárásával.

A hormonlaboratóriumi mérésekben az anti-TPO-nál poliklonális antitest tesztet (Elecsys Anti-TPO assay), az anti-TG esetén monoklonális antitest tesztet (Elecsys Anti-Tg assay), a TSH-nál monoklonális antitest tesztet (Elecsys TSH assay) alkalmaztunk, az electrochemiluminescens immunoassay mérési eljárásokhoz. Az eredmények statisztikai elemzésekor SPSS (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA, version 22.0) és Statisztikai szoftvert (Statistica 9.0, Statsoft, Tulsa, OK) használtunk.

B, *In vitro* és *in vivo* kísérleti módszerek

I. Kísérleti modellek:

1. *Adenohypophysis (AdH) és prolaktinomás adenohypophysis (PRLOMA) vizsgálatok*

Leletezett Wistar ♀ patkányok (Charles River, Isaszeg, Magyarország, testsúly: 120-250g) kerültek felhasználásra az AdH és prolaktinomás adenohypophysis sejt kultúra modellek előállításához. Az állatok az Szegedi Tudományegyetem (SZTE) állattartási protokolljának megfelelően voltak kezelve és tartva a kutatás során (55-65% légtéri nedvességtartalom mellett, 22±2°C hőmérséklet és 12 órás sötét/világos periódusokban), vizsgálati csoportonként 10 állat. Standard pellet táplálékon és vízellátáson (kontroll és kezelt csoportokban) tartottuk az állatokat.

2. *Adenohypohysis (AdH) sejt kultúra*

Pentobarbitál anesztéziát követően (4,5 mg/testsúly kilogramm (tts. kg) Nembutal, Abbott, USA) az állatokat (Wistar ♀) dekapitáltuk és preparáló mikroszkóp alatt, sterilen eltávolítottuk

az AdH-eket. A primer monolayer sejt kultúrákhoz a disszociálást enzimatikusan (trypsin: 0,2 % /Sigma, Germany/, t: 30 min; collagenase /Sigma, Germany/: 30 µg/ml, t: 40 min; dispase /Sigma, Germany/: 50 µg/ml, t: 40 min foszfát /PBS-A/ pufferben; T: 37°C-on) és mechanikusan (nylon blutex filter: Ø: 83 és 48 µm) végeztük. A sejt szuszpenziók viabilitását Trypan-kék tesztel ellenőriztük, majd a magas viabilitású (>95%) sejt szuszpenziót 2×10^5 sejt/cm³ koncentrációban 5% kollagénnel felületkezelt 24 lyukú tenyésztő edényekbe /Nunc., Germany/ tettük, DMEM (Dulbecco's Modified Essential Medium /DMEM/ + 20% Fetal Calf Serum /FCS/ + antibiotikum /Penicillin+Streptomycin (PenStrep): 1,0 µg/ml/) tápoldatban. A kultúrákat T: 37 °C-on, CO₂ termosztátban (95% levegő és 5% CO₂) tartottuk és 3 naponta mostuk. Az AdH tenyészeteket funkcionálisan is standardizáltuk, a felülúszó médiumból történő PRL és ACTH (luminescens immunoassay (LIA) és radioimmunoassay (RIA) metodikák) meghatározásával, alap hormonürítési kinetika követésével, valamint kisózásos követéssel.

3. Prolaktinomás AdH és sejt kultúra (PRLOMA) kialakítása

A prolaktinomás AdH indukálása 6 hónapon át hetente szubkután öszttron-acetát (CAS bejegyzési szám: 901-93-9, Sigma, Germany; 150 µg/tts. kg/hét) beültetéssel történt. Pentobarbitál anesztéziát követően (4,5 mg/tts. kg Nembutal, Abbott, USA) az állatokat dekapitáltuk és preparáló mikroszkóp alatt, sterilen eltávolítottuk az AdH-eket. A primer monolayer sejt kultúrákhoz a disszociálást enzimatikusan (trypsin: 0,2 % /Sigma, Germany/, t: 30 min; collagenase /Sigma, Germany/: 30 µg/ml, t: 40 min; dispase /Sigma, Germany/: 50 µg/ml, t: 40 min foszfát /PBS-A/ pufferben; T: 37°C-on) és mechanikusan (nylon blutex filter: Ø: 83 és 48 µm) végeztük. A sejt szuszpenziók viabilitását Trypan-kék tesztel ellenőriztük, majd a magas viabilitású (>95%) sejt szuszpenziót 2×10^5 sejt/cm³ koncentrációban 5% kollagénnel felületkezelt 24 lyukú tenyésztő edényekbe /Nunc., Germany/ tettük, DMEM (Dulbecco's Modified Essential Medium /DMEM/ + 20% Fetal Calf Serum /FCS/ + antibiotikum /Penicillin+Streptomycin (PenStrep): 1,0 µg/ml/) tápoldatban. A kultúrákat T: 37 °C-on, CO₂ termosztátban (95% levegő és 5% CO₂) tartottuk és 3 naponta mostuk. A PRLOMA tenyészeteket funkcionálisan is standardizáltuk, a felülúszó médiumból történő PRL és ACTH (LIA és RIA metodikák) meghatározásával, alap hormonürítési kinetika követésével, valamint kisózásos követéssel.

4. Neurohypophysis (NH) sejt kultúra modell

A 3.B.I.1. és 3.B.I.2. pontban leírt módon leletezett, tartott és dekapitált, hím Wistar patkányok neurohypophysiséből steril körülmények között enzimátikus (0,2% trypsin /Sigma, Germany/ PBS B-ben és 0,05% collagenase /Sigma, Germany/), majd mechanikus (nylon blutex filteren ø: 100, 80, 48 µm) disszociálást után történt, az ellenőrzött viabilitású NH sejtek (2×10^5 /ml koncentrációban) kiültetése az 5% kollagénnel felületkezelt tenyésztő edényekbe /DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium; Sigma, Germany) + 20% FCS (Fetal Calf Serum - Gibco, USA) + 0,1 µg/ml PenStrep (Sigma, Germany) szupplementált tápoldatban/. A kultúrákat 37 °C-on, 5% CO₂ tenzióon tartottuk és 3 naponként mostuk friss szupplementált DMEM-mel. A kultúrákat funkcionálisan immunhisztokémiai eljárással standardizáltuk OT és AVP tartalom és release szerint (RIA eljárással).

II. ED kezelések

5. *Az extracelluláris ionmilieu változásainak vizsgálati protokollja AdH és PRLOMA sejt kultúrákon*

A standardizált AdH és PRLOMA kultúrákat Tyrode médiumban kondicionáltuk, majd a hypocalcémias kísérletekhez ($[Ca^{2+}]$: 0; 0,5; 1,0; 1,5 mM; n=12 csoportonként és 10 független esetben ismételve) időkinetikai vizsgálatokat végeztünk a 10, 20, 30, 60 és 90. percben az extracelluláris felülúszó médiumból történt mintavételekkel. Ezekből LIA és RIA metodikákkal ACTH-t és PRL-t határoztunk meg. A hormont kibocsájtó sejtek fehérjetartalmát módosított Lowry módszerrel és Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, USA) alkalmazásával mértük. A statisztikai analízishez SAS (Version 9.3 SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) programcsomagot használtunk.

6. *ED hatások vizsgálata AdH és PRLOMA sejt kultúra modelleken*

A 3.B.I.2. és 3.B.I.3. pontokban leírtak szerint kialakított AdH és PRLOMA sejt kultúrák funkcionális és viabilitási standardizálása után ED hatásokat uron származékokkal (PU [10^{-6} M], MU [10^{-6} M], DU [10^{-6} M]) és CIB-kal váltottunk ki (dCIB: [0,1 ng/ml] és mCIB [0,1 ng/ml]). Az ACTH hormonelválasztás szabályozott állapotciklusát AVP [10^{-6} M] és kortikoszteron (B, [1 μ g/ml]) önálló és kombinált alkalmazásával állítottuk be. Az ED ágenseket önmagukban és AVP jelenlétében adtuk a kísérleti rendszerhez, amelyből 60 perces kezelések után felülúszó médium mintákat vettünk. Ezekből ACTH és PRL meghatározást végeztünk LIA és RIA eljárásokkal. A hormont kibocsájtó sejtek fehérjetartalmát módosított Lowry módszerrel és Pierce BCA Protein Assay Kit–tel (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, USA) detektáltuk. A Mg^{2+} -függő adenosin-trifoszfát (ATP)-áz aktivitást módosított Martin és Doty módszerével határoztuk meg. A statisztikai analízishez SAS (Version 9.3 SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) programcsomagot használtunk.

7. *In vivo Wistar patkányok ED ágensekkel való kezelése*

In vivo Wistar hím patkányok mCIB kezelését (dózisok: 0,1; 1,0; és 10 μ g/tts. kg, n=10/csoport; kezelési időtartamok: 0 nap kontroll, kezelés: 30, 60, 90 nap) gyomorszonda segítségével végeztük el, max. 1 ml végtérfogatban. A kontroll rendszernél az abszolút kontrolloknál semmilyen kezelést nem alkalmaztunk, a stressz-kontrolloknál üres gyomorszonda alkalmazása történt, a negatív kontrolloknál 1 ml végtérfogatú ivóvíz került beadásra, a pozitív kontrolloknál a CIB oldószere (0,015 % etanol/desztillált víz) került azonos térfogatban bejuttatásra. A kísérleti protokoll időszávjában vett szérumból ACTH-t határoztunk meg (Immulite 2000 ACTH test kit, Siemens Healthcare Diagnostic, Deerfield, IL, USA); majd az 3.B.I.2. szerint AdH sejt kultúra modelleket készítettünk, és azoknál is követtük az ACTH elválasztást. A kontroll csoportok eredményei között nem észleltünk szignifikáns eltérést az ACTH mért értékeinek elemzésekor, így eredményeinknél csak az abszolút kontroll adatait tüntettük fel. A statisztikai analízishez IBM SPSS Statistics, Version 21 programcsomagot használtunk.

8. ED hatások vizsgálata NH kultúrákon

A standardizált, monolayer NH sejttenyészeteket (3.B.I.4.) *in vitro* kezeltük 10^{-6} M koncentrációban fenuron (PU, CAS bejegyzési szám: 101-42-8), diuron (DU, CAS bejegyzési szám: 330-54-1) és monuron (MU, CAS bejegyzési szám: 150-68-5) Sigma, Germany) ágensekkel, mint ED tényezőkkel. Az előzetesen standardizált monoamin receptorkapcsolt OT és AVP exocitózisok állapotciklusait alkalmaztuk kísérleti modellként. Ehhez 10^{-6} M koncentrációban adrenalin (A), noradrenalin (NA), szerotonin (5-HT), hisztamin (HA), dopamin (DA) (Sigma, Germany) monoaminokat használtunk. A kombinált monoamin + ED hatás követéséhez a következő kísérleti elrendezéseket alakítottuk ki: 1. A+PU, NA+PU, 5-HT+PU, HA+PU, DA+PU; 2. A+MU, NA+MU, 5-HT+MU, HA+MU, DA+MU; 3. A+DU, NA+DU, 5-HT+DU, HA+DU, DA+DU; melyekben azonos dózisban (10^{-6} M) kerültek a monoaminok és az ureaherbicidek felhasználásra. A kísérleti kezelések után a felülúszó médiumokból mintákat vettünk. Ezekből OT és AVP meghatározást végeztünk LIA és RIA eljárásokkal. A hormon kibocsájtó sejtek fehérjetartalmát módosított Lowry módszerrel és Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, USA) használatával detektáltuk. A statisztikai analízishez SAS (Version 9.3 SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) programcsomagot használtunk.

9. Az extrém alacsony frekvenciájú és dózisu elektromágneses tér (ELF-EMF) ED hatásvizsgálata *in vivo* expozícióval

Pulyka- (Meleagris gallopavo) modellt alakítottunk ki, melyben az ELF-EMF *in vivo* expozíciós hatások monitorozására magvas vörösvérsejtjeiket (vvs) alkalmaztuk. A pulykák állatorvosi ellenőrzése, leletezése, tartása az SZTE állatvédelmi követelményeinek megfelelően történt. A kísérleti rendszer kialakításakor a nőtény pulykákból csoportokat képeztünk a kezelési sémáknak megfelelően (abszolút kontroll /semmi beavatkozást nem kapnak/, negatív kontroll /megtörténik a kezelési pozíciók végigvitele/, pozitív kontroll /kezelési protokoll végigvitele bekapcsolt, de 0 állapotú expozícióban/, és a kezelt (kezelési protokoll szerint $\nu=50$ Hz, $B=10 \mu\text{T}$ intermittáló ELF-EMF kezelés, naponta háromszor /8 óránként/ 20 percig, 3 héten át, majd 5 héten át kezelés mentesen). A kezelési protokollnak megfelelően a klavikuláris vénákból vett vérmintákból vvs szeparálás történt, majd standardizált sejt szám mellett a béta-adrenerg receptor funkciókat követtük a NA aktivált (antagonista: propranolol jelenlétében is) intracelluláris 3'-5'-ciklikus-adenozin-monofoszfát (cAMP) tartalom (Amersham cAMP Biotrak EIA system, GE Healthcare) meghatározásával. A kezelt és a kezeletlen csoportokból származó adatok feldolgozása SAS (Version 9.3 SAS Institute Inc. Cary, NC, USA) programcsomaggal történt.

4. Eredmények

Az 2.1.a. célmegjelölés szerint vizsgáltuk, hogy az ED hatás kóroki tényező lehet-e pajzsmirigy szöveti transzformációs folyamatoknál? A 341 pajzsmirigy tumoros beteg diagnosztizálása során az amerikai és európai diagnosztikai ajánlások és minősítések szerint kerültek besorolásra az adott pajzsmirigy transzformációs zavarok. Az általunk továbbvizsgált betegcsoport kiválasztásánál (35 beteg) a diagnózis felállításakor meghatározott TSH, anti-TG és/vagy anti-TPO paraméterek ismerete volt meghatározó. A pajzsmirigy autoimmun eredményei 10 beteg esetén mutattak szignifikáns emelkedést és ezek koherens kapcsolatban voltak az ED hatásokkal. Így összefüggés mutatkozott a pajzsmirigy tumor malignitása és ezen biokémiai markerek emelkedettsége, valamint az ED hatások megléte között.

A 2.1.b. célmegfogalmazás vizsgálatában azt tanulmányoztuk, hogy hypophyseális szintű endokrin regulációs zavart hormon-mimetikus ED hatásokkal indukálhatunk-e? Amennyiben igen, akkor ez sejttanszformációs zavart gerjeszthet-e? Ösztradiol vegyülettel, Wistar (♀) patkányok *in vivo* krónikus kezelésével benignus adenohypophysis sejttanszformációs zavart indukáltunk, prolaktinomás adenohypophysis (PRLOMA) formában. Ezekből viabilitásra, és funkcionalitásra (aspecifikus, specifikus) standardizált monolayer sejtkultúrákat, mint *in vitro* modelleket állítottunk elő. Az egészséges patkány AdH PRL hormonelválasztásához viszonyítottan a PRLOMA PRL release szignifikánsan megemelkedett. Az ACTH elválasztás az AVP által aktivált szabályozási körben szintén erőteljesen fokozódott a PRLOMA kultúrákban az AdH tenyészetek hasonló kezelési mintáihoz képest. A hormontermelő sejtek differenciált és generális sejtfunciója a homeosztázis által fenntartott extracelluláris ionmilieu szabályozottsága mellett biztosított. Az extracelluláris tér hypoioniája, konkrétan a hypokalcémia a normál AdH és PRLOMA sejtek működésében egyértelműen változásokat mutatott. Az időben követett ACTH és PRL release kinetikák AdH tenyészeteknél karbantartott karakterisztikát prezentáltak a fizioiogiás szinthez közelebbi hypokalcémiákban. Viszont a PRLOMA esetén az ACTH és a PRL elválasztási kinetikák lefutása erősen divergáló és szignifikánsan eltérő volt a kontrolltól és az AdH mintázatoktól.

A 2.2. a, célkitűzési pont vizsgálata során az agráriumban alkalmazott fenilurea (PU) és további halogénezett szénhidrogén (dCIB, mCIB, MU, DU) vegyületek ED szerepét kívántuk tisztázni sejtkultúra (NH, AdH és PRLOMA) modelljeinkkel a hormonrelease funkciók (OT, AVP, ACTH, PRL) követésével. Eredményeink szerint az AdH modellek AVP által aktivált ACTH kibocsátását szignifikánsan megváltoztatták az uronok és a CIB származékok. PRLOMA esetén ugyanezen szabályozási kör alaprelease, aktivált és gátolt elválasztási paraméterei is megváltoztak. Az AdH modell PRL alaprelease értékelhető módosulást nem mutatott az uron és CIB származékok jelenlétében; azonban szignifikáns eltérést váltottak ki ugyanezen ágensek a PRLOMA PRL elválasztásában.

A NH sejtkultúra modellek esetén az OT és VP elválasztás szabályozásának vizsgálatára (monoamin aktivált) regulációs neuroendokrin ciklusokat alakítottunk ki és standardizáltunk. Ebben a rendszerben az uron származékok OT hormonrelease változásokat okoztak, melyek a noradrenalin esetén erős, a hisztamin, adrenalin és dopamin esetén mérsékeltebb, a szerotonin

esetén gyenge hatásokban nyilvánultak meg. Ugyanezen vizsgálati modellben az AVP release-t a nevezett expozítorok módosították az összes monoamin aktivált állapotciklusban (DA, NA: erős; A, 5-HT: mérsékelt; HA: gyenge hatás).

A mCIB dózis (0,1; 1,0; 10 $\mu\text{g}/\text{ts kg}$) és időfüggésének (0. nap: kontroll, kezelés időtartamok: 30, 60, 90 nap) vizsgálatát *in vivo* kezelésben végeztük el. Kísérleteink eredményei szerint a szérum ACTH szint a mCIB kezelésekkel idő és dózisfüggő módon szignifikánsan emelkedett. Az *in vivo* kísérleti mCIB expozíciókból származó AdH kultúrák ACTH elválasztása is idő és dózisfüggően és szignifikánsan emelkedett. Ebben a protokollban követtük az AdH kultúrák magnézium-függő ATP-áz által közvetített energiatranszferét is, melyet szignifikánsan módosítottak a kontroll értékekhez képest a mCIB kezelések idő és dózisfüggés szerint.

A 2.2.b. célmegjelölési pont vizsgálatára során tanulmányoztuk, hogy az ED hatások nemcsak kémiai induktorokkal generálhatók, hanem fizikai hatásokkal is. Az extrém kis frekvenciájú és dózisú elektromágneses erőtér (ELF-EMF) ilyen szempontból kérdéses tényező. Ennek a hatásnak a vizsgálatára *in vivo* pulyka expozíciós modellt dolgoztunk ki, amelyben a kezelési időtartamok függvényében követtük a sejtmembrán noradrenalin által aktivált béta-receptorfunkcióját az intracellulárisan szintetizált cAMP szintek mérésével. Eredményeink szerint az ELF EMF expozíciót követő cAMP szintézis szignifikánsan csökkent a kezeletlen állapothoz képest. Ugyanakkor azt is igazoltuk, hogy ez a folyamat a mi modellünkben reverzibilis volt, mert a kezelést követő 5 héten át tartó kezelés nélküli kísérleti állapot után a cAMP paraméterek a kontroll szintre visszajavultak.

5. Összegzés

1.

Az ED tényezők expozícióira következményesen megjelenő egészségügyi problémák, és azok patomechanizmusainak feltárása a diagnosztikus folyamat és a terápiás gyakorlat szempontjából is jelentős. Ezért a betegvizsgálatokban az anamnézis felvétele során az ED hatótényezők feltárása (munkahelyi és foglalkozási, lakókörnyezetben, életvitel során, elektromos készülékek/eszközök a lakásban és a lakókörnyezetben, munkahelyen és környezetében) indokolt, amivel az Endokrin Társaságok (ATA, ETA) betegvizsgálati ajánlásait célszerű volna kiegészíteni. A biokémiai paraméterek között, ha az ED tényezőknek való kitettség nagy, érdemes lehet meghatározni az anti-TG és/vagy anti-TPO titerét a vérérszékben. Az ATA és ETA eredményekkel összevetve figyelemre méltó, hogy minden malignus pajzsmirigy tumoros beteg, akiket vizsgáltam és ED hatást szenvedett el, emelkedett anti-TG és/vagy anti-TPO értékekkel rendelkezett. Ezek szerint, a krónikus ED kitettség gyulladáson keresztül malignus események kiváltásában érintett lehet.

Amennyiben az ED tényezők karakterizálása, osztályozása egy big-data rendszerben kezelve elérhetővé válik, úgy a preventív megoldásokkal már az endokrin betegségek kialakulási és prediálási kockázatainak csökkentése is lehetségessé válhat. (2.1.a cél szerint)

2.

A hypophysis benignus szöveti proliferációs betegsége a prolactinoma, amelynek kóroki tényezőjeként endokrin szabályozási zavart kísérletesen generáltunk. Azon ED tényezők, amelyek elsődleges, vagy másodlagos hatásukkal szimulálják az *in vitro* prolaktinomás adenohypophysis (PRLOMA) modellünk szerinti strukturális elváltozásokat, mind sejtranszformációs zavart okoznak (pl. ösztrogén mimetikumok). A kiváltó ED hatások mellett a krónikus ED hatások benignus endokrin zavarok esetén történő kutatására is alkalmas modellt sikerült így standardizálnunk, amely a BOOLE hálózati algoritmusok követelményeinek megfelelően vizsgálható (2.1. b cél szerint).

3.

Igazoltta vált, hogy az AVP által indukált ACTH release AdH és PRLOMA esetén is eltolódik, ami a regulációs zavart PRLOMA esetén fokozza. Amennyiben ezt a két modellt tovább terheljük ED expozíciókkal, amelyeket elsődleges (közvetlen) és/vagy másodlagos (közvetett) ED tényezőkként sorolunk be, akkor a PRLOMA egyre instabilabbá válik, mert az egészséges ciklusra jellemző kompenzációs mechanizmusokat nem tudja prezentálni. A PRLOMA tehát pl. ED tényezők szubtoxikus dózisu jelenlétében - regulációs instabilitásának következtében - átbillenhet egy minőségileg új rendszerciklusba.

Megállapítottuk, hogy mind egészséges adenohypophysis, mind prolaktinomás adenohypophysis ACTH, PRL elválasztása tekintetében elsődleges ED hatásának minősíthetjük az uron vegyületeket (fenuron, monuron, diuron), valamint a klórbenzolokat (1,2,4,-triklór-benzol+hexaklórbenzol=1:1; 1,4-diklór-benzol). A neurohypophysis sejtek monoamin (DA, NA, A, 5-HT, HA) által aktivált OT, AVP elválasztásának követésével is igazoltuk az uron ágensek elsődleges ED hatásait.

Másodlagos ED hatásúként kezelhetjük azokat az ED hatásokat, amelyek nem közvetlenül zavarják az endokriniumot, hanem, az „ÉS” függvények valamelyikének (esetünkben az ionmilieu – Ca^{2+}) zavarán keresztül. A PRLOMA regulációs viselkedése másodlagos ED hatásokra is nagyfokú instabilitást mutat az egészséges AdH sejtekéhez viszonyítottan. (2.2. a cél szerint)

4.

Az ED tényezők kiváltotta biológiai hatásokat az ISO 14040 szabványcsomag (- amely az életciklus szerinti vizsgálatokat preferálja -), az ökotoxikológiai potenciál (ETP) és a humántoxicitási potenciál (HTP) vonatkozásában is a dCIB hatásaira standardizálja. Ennek megfelelően vezettük be mi is a nevezett standard hatás vizsgálatát munkánkba, és tartjuk fontosnak ezután minden endokrin betegség kiváltásában jelentős EDC besorolásához ezen hatás(ok) mérését és adatbázisban való rögzítését. (2.2. a cél szerint)

5.

A kémiai ágensek kiváltotta ED hatások mellett a fizikai hatótényezők ED szerepének tisztázását is megkezdjük. Expozitorként ELF-EMF hatásokat *in vivo* tanulmányoztunk.

Megállapítottuk, hogy a sejtmembrán funkcionális aktivitását az ELF-EMF krónikus kezelési séma szerinti alkalmazásával szignifikánsan módosíthattuk. Kutatási rendszerünkben receptor - agonista/antagonista attraktort (állapotciklust) állítottunk be vizsgálati modellként, hasonlóan a korábbi hypophysis-release modellekhez. Az EMF hatást ED tényezőként jelölhetjük meg, bármely béta-receptorhoz kapcsolt hormonrelease tekintetében.

Az ELF-EMF hatás reverzibilitási vizsgálati modelljét is kialakítottuk, amely a hatáserősségek és hatásperiódusok meghatározásával jelentős információkat szolgáltat a tervezett adatrendszer kialakításához. (2.2. b cél szerint)

Köszönetnyilvánítás

Őszintén köszönöm *Dr. Valkusz Zsuzsanna* Ph.D. dolgozatom elkészüléséhez nyújtott támogatását.

Köszönettel tartozom a kutatási feladatok ellátásában közreműködő Környezet-toxikológiai Kutató Laboratórium (Reg. No: MU 69260609 0001) kutatócsoportjának.

Köszönöm *Miczák Péternek*, hogy Ph.D. dolgozatom angol nyelvi olvashatóságát és érthetőségét javította.

Köszönöm Családomnak a megértést, a türelmet és a bátorítást.

A kutatási és publikációs munka kivitelezését támogatta: EFOP-3.6.1-16-2016-00008 and EFOP-3.4.3-16-2016-00014.