

**Környezetterhelő halogénezett szénhidrogének hatása neuroendokrin
szabályozással irányított alkalmazkodásban**

Ph.D. értekezés

Dr. Valkusz Zsuzsanna

Témavezető: Dr. Gálfi Márta habilitált főiskolai tanár

Környezettudományi Doktori iskola

Szegedi Tudományegyetem Környezettudományi Intézet
Környezet-biológia és Környezeti Nevelés Tanszék
SZTE TTIK

2011

Szeged

Tartalomjegyzék

RÖVIDÍTÉSEK.....	4
1. BEVEZETÉS	5
1.1. KÖRNYEZET, RENDSZER, ALKALMAZKODÁS, HOMEOSZTÁZIS	5
1.2. A VISELKEDÉS	6
1.2.1. A szorongás (anxietás)	7
1.2.2. Az agresszió	7
1.3. KÖRNYEZETTERHELÉSEK ÉS VISELKEDÉS	8
1.3.1. Perzisztens, szerves szennyező anyagok, endokrin diszruptorok.....	8
1.3.2. Endokrin hatású környezetterhelő vegyületek	8
1.3.3. Klórbenzolok.....	9
1.3.3.1. Klórbenzol expozíciók és jellemzőik.....	10
1.3.3.3. Klórbenzolok agresszióra és/vagy szorongásra gyakorolt hatásai	11
1.4. VISELKEDÉSELEMEK ÉS MONOAMINERG PÁLYARENDSZEREK.....	12
1.4.1. A szerotonin (5-HT) és pályarendszerei.....	13
1.4.1.1. Központi idegrendszeri szerotoninerger rendszerek	14
1.4.1.2. A hipotalamusz és hipofízis szerotoninerger rendszerei	15
1.4.1.3. A szerotonin szerepe a szorongásban és az agresszióban	15
1.4.2. Noradrenalin (NA) és pályarendszerei	16
1.4.2.1. Központi idegrendszeri noradrenerg rendszerek	16
1.4.2.2. A hipotalamusz noradrenerg rendszere	17
1.4.2.3. A noradrenalin szerepe a szorongásban és az agresszióban	17
1.5. A HIPOTALAMO-NEUROHIPOFÍZEÁLIS RENDSZER	18
1.5.1. Arginin-Vazopresszin (AVP) és pályarendszerei	18
1.5.1.1. Központi idegrendszeri arginin-vazopresszinerg (AVP-erg) rendszerek	18
1.5.1.2. Az arginin-vazopresszin szerepe a szorongásban és az agresszióban	19
1.5.2. Oxytocin (OT) és pályarendszerei.....	19
1.5.2.1. Központi idegrendszeri oxytocinerg rendszerek	20
1.5.2.2. Az oxytocin (OT) szerepe a szorongásban és az agresszióban	20
2. CÉLKITŰZÉS	21
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	23
3.1. ANYAGOK.....	23
3.2. KÍSÉRLETI ÁLLATOK	23
IN VIVO VIZSGÁLATI PROTOKOLLOK	23
3.3. ALKALMAZOTT EXPOZÍCIÓK ÉS KÍSÉRLETI CSOPORTOK	23
3.4. KÍSÉRLETI PROTOKOLL	24
3.5. VISELKEDÉS VIZSGÁLATOK	25
3.5.1. Open field (OF) teszt.....	25
3.5.2. Elevated plus maze (EPM) teszt.....	26
3.5.3. Hímek közötti agresszivitás vizsgálata (RI teszt)	26
IN VITRO VIZSGÁLATOK.....	27
3.6. NEUROHIPOFÍZIS (NH) MONOLAYER SEJTKULTÚRÁK	27
3.6.1. A NH monolayer sejt kultúrák sejt fiziológiai követése.....	27
3.7. ADENOHIPOFÍZIS (AdH) MONOLAYER SEJTKULTÚRÁK	28
3.7.1. Az AdH monolayer sejt kultúrák sejt fiziológiai követése	28
3.8. IN VITRO VIZSGÁLATOK	28
3.9. NH MONOAMIN RECEPTOR VIZSGÁLATOK	29
3.10. HORMON MÉRÉSEK	29
3.10.1. AVP, OT és ACTH meghatározás felülhúzó médiumból.....	29
3.10.2. AVP, OT és ACTH meghatározása szérumból	29
3.11. STATISZTIKAI ANALÍZIS	30
4. EREDMÉNYEK	31
4.1. ALKALMAZOTT KONTROLLRENDSZER	31
4.2. KOMBINÁLT KLÓRBENZOL EXPOZÍCIÓK TOXICITÁSI VIZSGÁLATAINAK EREDMÉNYEI.....	31
4.3. SZÉRUM VP, OT ÉS ACTH ÉRTÉKEK.....	32
4.4. HIPOFÍZIS SEJTKULTÚRÁK HORMON SZEKRÉCIÓJA	34
4.4.1. A NH sejt kultúrák bazális és monoamin mediált vazopresszin (VP) szekréciója	34

4.4.2. A NH sejt kultúrák bazális és monoamin mediált oxytocin (OT) szekréciója	36
4.4.3. A kombinált klórbenzol kezelt patkányok adenohipofízis (AdH) sejt kultúráinak ACTH elválasztása	38
4.5. A KOMBINÁLT KLÓRBENZOL EXPOZÍCIÓK HATÁSA A SZORONGÁSOS VISELKEDÉSMINTÁZATOKRA	39
4.5.1. Viselkedéselemek az OF tesztekben	39
4.5.2. A kombinált klórbenzol kezelés hatása a viselkedés EPM tesztekkel detektálható elemeire	41
4.6. A KOMBINÁLT KRÓNIKUS KLÓRBENZOL EXPOZÍCIÓK HATÁSA AZ AGRESSZÍV VISELKEDÉSI ELEMekre	42
4.6.1. Krónikus kombinált CLB kezelések hatása a viselkedéselemekre a RI tesztekben	42
5. MEGBESZÉLÉS, KÖVETKEZTETÉSEK	44
7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	51
8. FELHASZNÁLT IRODALOM	52
9. ÖSSZEFOGLALÁS	68
10. SUMMARY	73

Rövidítések

5-HIAA	5-Hidroxi-Indol-Ecetsav
5-HT	5-Hidroxi-Triptamin/Szerotonin
5-HT-erg	Szerotoninerg
A	Adrenalin
A-erg	Adrenerg
ACTH	Adrenocorticotrop Releasing Hormone
ANOVA	Egy szempontos Varianciaanalízis/Analysis of Variance
COMT	Catechol-O-Metiltranszferáz
CRH	Corticotrop Releasing Hormone
DA	Dopamin
DDT	Diklór-Difenil-Triklór-Etán
DMEM	Dulbecco's Modified Essential Medium
EDC	Endocrine Disrupting Chemicals/Hormonháztartást Megzavaró Anyagok
EDTA	Etilén-Diamin-Tetraecetsav (dinátrium sója)
EPM	Elevated Plus Maze/Emelt keresztlabirintus teszt
FCS	Foetal Calf Serum
GGT	Gamma-Glutamil-Transzpeptidáz
HCB	Hexachlorobenzene/Hexaklórbenzol
IARC	International Agency for Research on Cancer
LC	Locus Coeruleus
LDCV	Large Dense Core Vesicle
L-DOPA	L-Dihidroxi-Fenilalanin
MAO A	Monoamin Oxidáz A
MAO B	Monoamin Oxidáz B
NA	Noradrenalin
NA-erg	Noradrenerg
OF	Open Field/Nyílt porond teszt
OT	Oxytocin
OT-erg	Oxytocinerg
PAH	Polycyclic Aromatic Hydrocarbons/Policiklusos Aromás Szénhidrogének
PCB	Polychlorinated Biphenyls/Poliklórozott Bifenilek
POP	Persistent Organic Pollutants/Perzisztens Szerves Szennyezőanyagok
PVN	Nucleus Paraventricularis
RIA	Radioimmunoassay
SCN	Nucleus Suprachiasmaticus
SGOT	Szérum Glutamát-Oxálacetát-Transzamináz
SGPT	Szérum Glutamát-Piruvát-Transzamináz
SON	Nucleus Supraopticus
SSRI	Szelektív Szerotonin Reuptake Inhibitor
TCB	Trichlorobenzene/Triklórbenzol
VP	Vazopresszin
AVP	arginin-vazopresszin
VP-erg	Vazopresszinerg

1. Bevezetés

1.1. Környezet, rendszer, alkalmazkodás, homeosztázis

Az élővilág és környezete között fennálló állandó kölcsönhatás, illetve folyamatos energia- és anyag kicserélődés tartja fenn az élő (biotikus) és élettelen (abiotikus) rendszerek kommunikációs egyensúlyát. A földi viszonyok mellett az anyagi rendszerek és az azokat determináló környezet alapvető törvényszerűsége a *funkcionalitás*, amely az aktuális alkalmazkodási mintázat fenntartását biztosító (élet)folyamatok összessége.

Az emberi tevékenység a természetes evolúciós környezet „turn-over”-ét igen erősen megváltoztatja. Az antropogén változások követése (pl. gazdasági, szociális, stb.) és következményeinek feltárása így fontos feladat a környezet és az azon egyensúlytartásra képes rendszerek fenntarthatósága miatt [1].

A környezet és rendszer viszonyát az alkalmazkodó képességgel jellemezhetjük, amit az abiotikus rendszereknél adaptációnak, a biotikus rendszereknél akkomodációnak nevezünk [2, 3, 4].

Az *alkalmazkodás* egyensúlyi kommunikáció, folyamatkaskád, melynek során a folyton változó anyag „kitüntetett” szempontok szerinti struktúrába, rendszerbe szerveződik. Az evolúció, ok - okozati tényezőkkel összehangolt állandó változásfolyama során az eltérő stabilitású energia/anyag diverzitás sokasága jelenik meg a Földön [5, 6].

Az *élő rendszerek*, korlátozott szabadságfokkal jellemezhető biológiai-rendszerek, amelyek a földi környezetben átmeneti egyensúlyi állapotokat képesek fenntartani. A biológiai rendszerek egyensúlyi integritását és belső szervezeti stabilitását a növekvő komplexitású bioszabályozási hálózatok tartják fenn. (A *homeosztázis* görög eredetű szó, jelentése: „hasonló állapot”) [7]. A homeosztázis révén az élő szervezet egyensúlyi állapotot tart fenn a környezetével, alkalmazkodik a változó külső és belső körülményekhez. Az aktuális egyensúlyi állapot a környezeti paraméterek hatására kialakult biokommunikációs folyamatok változásaként értelmezhető [8]. Az alkalmazkodásban a biokommunikáció az inger- és választovábbítás módosulásában jelenik meg, az adott környezeti feltételeknek megfelelő homeosztatisz optimum kialakulását jelenti [9]. A biológiai rendszerek kontrollmechanizmusa a normáltól eltérő állapotot akkomodatív válasszal az egyensúlyi állapothoz tereli vissza. A hatékony alkalmazkodású élő szervezetek először neurogén, majd neuroendokrin, ezután neuroendokrin-immun és a jelenleg ismert legmagasabb szintű pszicho-neuroendokrin-immun kommunikációs akkomodációt mutatnak.

A (pszicho)neuroendokrin-immun rendszer egységességére utal, hogy a neuroendokrin és immunmediátorok azonosak is lehetnek, és egymás működését szabályozhatják (pl. interleukinek, neurotranszmitterek, releasing faktorok, trophormonok, stb.). A komplex fiziológiai folyamatok optimalizálása egy lassú evolúciós turn-over-t feltételez, mivel az élő biológiai struktúra átalakulási képességének a szabadságfoka határozza meg annak időtartamát és korlátait. Ezt támasztják alá a biológiai rendszerek genetikai struktúráinak változásai és a környezeti hatások epigenetikusan megjelenő formái (pl. endokrin szabályozási eltérések és a sejt differenciáció zavarai a pajzsmirigy tumorok esetén) [10, 11].

A magasabb rendű gerincesek a környezetükben bekövetkező változásokra rendkívül gyors reakcióval, a viselkedésnek nevezett homeosztatisztikus válasszal reagálnak (ilyen reakció alacsonyabb rendűeknél is megtalálható, de nem minden esetben észrevehető) [12]. Mindez az adott organizmus meglévő fiziológiai folyamatainak módosulásaival értelmezhető, s azonnali válaszreakcióként jelentkezik. Ez az alkalmazkodási forma gyors, amelyet nem követ szükségszerűen a biológiai folyamatokat meghatározó stabil struktúra változása. A szervezetben egyidejűleg zajló biológiai folyamatok sokasága meghatározott struktúra és szabályozás szerint történik. A struktúrára ható minimális változások a rendszer működését alapvetően nem változtatják meg, de a folyamatok előrehaladásában szerepet játszó, irányító anyag- és energiakommunikáció feltételei már diszkrétan módosulnak. Így az említett folyamatok sokasága a korábban észlelt állapottól eltérővé válik. Ezen fiziológiai folyamat-eltérések a biológiai rendszert nem billentik ki egyensúlyából, de a rendszeren belül lokalizáltan eltérő működéseket okoznak.

A viselkedés a környezeti ingerre megjelenő gyors biológiai válasz, amely jól detektálható, és az azt meghatározó homeosztatisztikus fiziológiai folyamatok ok-okozati összefüggéseinek feltárásával tanulmányozható [13].

A biológiai rendszerek homeosztatisztikus fiziológiai folyamatai a véletlenszerű, párhuzamos működésű hálózatok algoritmusaival modellezhetők. Ezáltal a környezethez, mint kötelező feltételrendszerhez való alkalmazkodás a hierarchikus szabályrendszerek algoritmusaival vizsgálható. Ezen algoritmusokkal követhető rendszer-alkalmazkodás egy olyan optimalizálás, amely meghatározott környezeti paraméterekre nézve adott konfidencia intervallumokkal értelmezett szervezeti egyensúlyt képvisel [14].

1.2. A viselkedés

A viselkedés (magatartás) az élő szervezet folyamatos – forma és funkció szerint leírható – működésének eredménye, amely következményekkel jár az egyedre és/vagy a környezetre

nézve (különböző testhelyzetek, mozdulatok stb.). A homeosztatikus folyamatok és a viselkedés fiziológiai egységet képviselnek. Amennyiben a környezet, mint feltételrendszer paraméterei megváltoznak, pl. stressz-hatás éri az élő rendszert, az adott egyed megfelelő viselkedésmintázattal reagálva biztosítja homeosztázisának állandóságát. A környezeti ingerekre, azaz a stresszre kialakított reakciók a túléléshez és a szaporodáshoz egyaránt szükségesek és nélkülözhetetlenek. A homeosztázis szabályozásában a fiziológiai feed-back és egyéb szabályozó mechanizmusok, a viselkedés ösztönös és/vagy tanult feed-forward válaszmechanizmusain keresztül érvényesülnek [12, 15].

Ezen folyamatok során állandóan kifejezésre kerül az illető egyedre jellemző külső-belső fizikai, ösztönös és/vagy tanult viselkedés, melyben az aktivitás, vagy annak hiánya, a szorongás, a félelem, a vágy, a hajlamok, az emóciók, a társegyedekhez való viszonyulás (minősége) az agresszivitás és a dominancia is determinált [16].

1.2.1. A szorongás (anxietás)

A szorongás olyan érzelmi állapotot jelöl, melyre a félelem, a kellemetlen és rossz előérzet a jellemző (pl. a bizonytalan jövőtől, döntésképtelenségtől való félelem).

A szorongás valamilyen veszélyre vagy fenyegetésre adott élettani válasz, melynek során a test és a lélek egyaránt az adott problémára összpontosít. Melynek során a fiziológiai funkciók felkészülnek a válaszlépésre, miközben az „agy” végiggondolja a lehetséges menekülő-utakat és veszélyforrásokat. Ez egy komplex hangulati mintázat. A szorongást jellemző folyamatos félelemérzés, gyakran csak a félelmetesnek vélt fenyegető dolgokra irányul, amit negatív közérzet és biztonságot nyújtó objektumok (pl. búvóhely, csoport) keresése egészít ki. Normális válaszreakciónak tekinthető a környezeti stresszre adott, fenyegető helyzetekben megfigyelhető szorongás, hiszen a természetes szorongás elengedhetetlen az egyed környezeti kihívásoknak való megfeleléséhez. A túlzott mértékű anxietás káros az egyedre, amit számos pszichiátriai kórkép is igazol (pl. pánikbetegségek, fóbiák, poszttraumás stressz okozta betegségek, depresszió) [17, 18].

1.2.2. Az agresszió

Természetes körülmények között az élőlények folyamatosan versengenek az életfeltételeik alapjait jelentő forrásokért (táplálék, terület, búvóhely, stb.). A versengés elősegíti az előnyösebb adottságokkal rendelkező egyedek szaporodását és a források csoporton belüli optimális elosztását. Az olyan versengéseket és a versenyben megjelenő komplex mintázatokat, melynek során (általában) a fajhoz tartozó egyedek egymást igyekeznek a vitális forrásokból kiszorítani, vagy a forrás megszerzésében gátolni, agresszióknak nevezzük.

Agresszió minden olyan viselkedésforma, amelynek célja a másik egyednek sérelmet, kárt okozni (pl. a fajtárs eltávolítására irányuló magatartás) [19-20]. Az agresszió minden emlős fajban megjelenik és alapvető fontosságú az élőlény túlélése szempontjából.

Humán vonatkozásban az agresszió két fő típusa különíthető el:

- az impulzív (reaktív, ellenséges, affektív) agresszió és
- a kontrollált (proaktív, instrumentális, ragadozó) agresszió [21].

Az impulzív agresszió hasonlóságot mutat az állatokban megfigyelhető offenzív magatartás-elemekkel, amelyet főként akkor észlelünk, ha a felnőtt állat harcol, vagy védi az erőforrásokat (pl. az élelmet, a territóriumot, a nőstényeket) [22]. A kontrollált agresszió az állatvilágban a defenzív viselkedés-mintázattal vonható párhuzamba. Ez akkor jelenik meg, ha az állatot egy fajtársa vagy egy ellenséges ragadozó megtámadja [22, 23].

1.3. Környezetterhelések és viselkedés

1.3.1. Perzisztens, szerves szennyező anyagok, endokrin diszruptorok

A kemikáliák a társadalmak által az iparban és a mezőgazdaságban széleskörűen használt vegyületek. Ezen kémiai anyagok között található olyan különösen jelentős környezeti kockázatot képviselő vegyületek, melyeket perzisztens (stabil kémiai szerkezetük okán nehezen bomló) szerves szennyező anyagoknak (POP/Persistent Organic Pollutant vegyületeknek) nevezünk. Szélesebb körű alkalmazásuk során igazolták, hogy erősen módosítják az élő szervezetek homeosztatikus funkcióit [24], így pl. az endokrin kommunikációt is. POP vegyületek lehetnek a polihalogénezett (pl. diklór-difenil-triklór-etán /DDT/, hexaklórbenzol /HCB/, poliklórozott bifenilek /PCB/, dioxinok és furánok) és poliaromás szénhidrogének (PAH-ok). A felsoroltak közül számos vegyületet peszticidként alkalmaztak, bár néhányukat (pl. a HCB-t, a DDT-t, az aldrint, a mirexet, a dieldrint, a toxaphene-t) a fejlett országokban napjainkra betiltották.

A POP vegyületek tehát perzisztensek, vízben való oldhatóságuk alacsony, azaz lipofil természetűek, ezért elsősorban az élőlények zsírban gazdag szöveteiben akkumulálódnak [25].

1.3.2. Endokrin hatású környezetterhelő vegyületek

A POP vegyületek heterogén csoportjába a hormonháztartást, az endokrin kommunikációt zavaró anyagokat sorolhatjuk, melyeket endokrin diszruptor (EDC) vegyületeknek nevezünk. Az EDC anyagok bizonyítottan hatással vannak a homeosztázisra és/vagy annak szabályozására [26, 27]. Az EDC-k befolyásolhatják az embriogenezist (spontán abortusz

kockázatának növekedése, intrauterin növekedési visszamaradás, koraszülés, alacsonyabb születési súly, fejlődési rendellenességek gyakoribb előfordulása) [25, 28]. Ismert a karcinogén, az immunotoxikus [25], a neuromuszkuláris funkció [38] és a koordinációs zavart [28] okozó hatásuk is. Napjainkban kutatott a magatartásaktivitás változására [28, 29], a tanulási és kognitív képességekre [28], valamint a memóriára és a mentális funkciókra gyakorolt hatásaik [28].

Az EDC vegyületek viselkedésre vonatkozó hatásainak tanulmányozása során a szexuális viselkedés [28,30], az emocionális tónus [31], a motiváció, a kommunikáció [28], a szorongás [31], az agresszió [28, 32, 33], a dominancia, továbbá a szociális viselkedésformákra [28] kifejtett hatásaik a legfontosabbak.

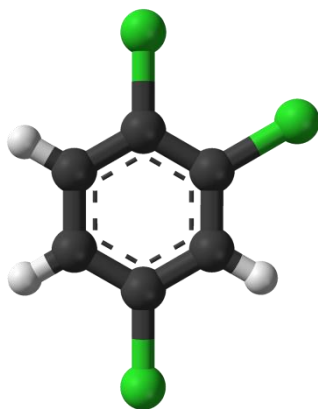
Az EDC vegyületek aktiválhatják vagy gátolhatják az endokrin rendszert, így a hormonok szintézisét, tárolását, felszabadulását, transzportját és metabolizmusát, valamint a receptor felismerést, kötődést, továbbá beleszólhatnak az indukált válaszokat érintő neuroendokrin folyamatokba.

Az EDC vegyületek hatásai a szexuáliszteroidokra és a pajzsmirigy hormonokra igazolt [34]. A központi idegrendszerben az endokrin válaszokért és a magatartásfunkciókért felelős struktúrák közösek, így a hormonok gyakran direkt hatással lehetnek a viselkedésre (és fordítva), vagy a metabolizmus módosításán keresztül indirekt módon is befolyásolhatják azt [28].

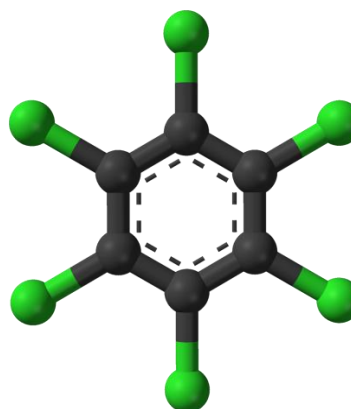
1.3.3. Klórbenzolok

A POP csoportba tartozó klórbenzolok közül elsősorban a HCB hatásait tanulmányozták, melyek részben EDC tulajdonságúak [35, 36] (1., 2. ábra).

A triklórbenzol (TCB) izomerek közül az 1,2,4-triklórbenzol kémiai folyamatok intermediere. Szigetelőanyagként, hőcserélőként, szintetikus olajok, stb. összetevőjeként, valamint fafelületek konzerválására, festékiparban, és a trópusokon inszekticidként használják. Az 1933 óta iparszerűen gyártott HCB-kat eleinte gombaölőként (fungicid) használták termények (búza, árpa, rozs, zab) kezelésére, majd pl. fafelületek konzerválására, alkalmazták az alumínium- és festékgyártásban, valamint a pirotechnikában. Napjainkra a HCB felhasználása az 1970-es évekhez képest 70-95%-kal csökkent. Ugyanakkor a környezetben mérhető hosszú felezési idejű HCB legnagyobb része a korábbi környezeti körforgásból az üledékekbe és a talajba került. Egyes országokban még ma is használják segédanyagként a klórtartalmú oldószerek és peszticidek gyártása során [35].



1. ábra – 1,2,4-Triklórbenzol



2. ábra - Hexaklórbenzol

A triklórbenzol (TCB), valamint a HCB a benzol származékai. Előbbiben három, az utóbbiban hat klóratom szubsztituálja a benzolgyűrű hidrogénatomjait. A TCB jellegzetes szagú, színtelen; folyadék, vagy szilárd formában található. Szerves oldószerekben oldódik, vízben szinte oldhatatlan. A HCB fehér, kristályos anyag. Stabil, nem reaktív vegyület (olefinekhez képest csökkent reakciókészség, addícióra való alacsony hajlam, nehéz oxidálhatóság, jellegzetes szubsztitúciós átalakulásokra való hajlam jellemzi) [37].

1.3.3.1. Klórbenzol expozíciók és jellemzőik

A környezetben kialakult anyagkörforgás során a klórbenzolok akkumulálódhatnak a növényi és állati szervezetekben [35]. A humán populáció klórbenzol expozíciója a klórtartalmú szerves vegyületek előállítása és felhasználása során egyaránt előfordulhat. Az expozíció a gastrointestinalis rendszeren keresztül (szennyezett élelmiszer /pl. halak, vadhús/ illetve víz fogyasztása), a tüdőn (inhalációval) és a bőrön át (transzporttal) valósul meg a leggyakrabban [38]. Humán vizsgálatokból és állatkísérletekből ismert, hogy a klórbenzolok lipofil tulajdonságaik révén átjutnak a placentán, és koncentrálnak az anyatejben. Az anyatej klórbenzol tartalma korrelál az anyai szérumban mérhető értékekkel, amit a tanulmányokban a peripartum anyatej, a terhesség alatti anyai szérum, vagy a köldökzsinór vér klórbenzol koncentráció meghatározásával követnek [39].

A HCB-t az International Agency for Research on Cancer (IARC) 2B (humán karcinogenitása lehetséges) és 3A (bizonyítottan állati karcinogén) csoportba tartozó karcinogénként osztályozta. A HCB ismert endokrin hatása, hogy zavarja a pajzsmirigyműködést, valamint egyéb okozott fiziológiai hatásai a máj, a vese, a csont és a bőr, stb. dóziszfüggő funkcióinak megváltoztatása [40].

1.3.3.2. Klórbenzolok neurotoxikus vonatkozásai

A HCB neurotoxikus sajátosságait elsősorban egyes kognitív és spontán lokomóciót determináló viselkedéselemek vonatkozásában vizsgálták, az anxiatással és az agresszióval kapcsolatos hatásairól kevesebb irodalmi adat található.

Az állatkísérletes munkák zömében általában azt vizsgálták, hogy a pre- és/vagy a posztnatális, krónikus anyai HCB expozíciók milyen hatással lehetnek az utódokra. A rágcsálókban hiperaktivitást és hiperexcitabilitást [41, 42, 43], valamint egyéb tremorral, tónusos rángásokkal járó abnormális mozgásformákat figyeltek meg [44]. Diszkrét változások detektálhatók az olyan kognitív funkciókban is, mint a tanulás, vagy a memória [42; 43]. Humán tanulmányokban leginkább a prenatális, placentális HCB expozíciók hatásait vizsgálták. Gyermekek idegrendszeri fejlődésében elenyésző, általában nem szignifikáns változásokat sikerült detektálni [45]. A jelentősen HCB-szennyezett spanyolországi Menorca-ban és Flix-ben tapasztalt eredmények alapján azonban szignifikáns összefüggés volt megfigyelhető a köldökzsinór vér magasabb HCB tartalma és a négy éves korban észlelhető társas kapcsolatok csökkenése, valamint a figyelemhiányos hiperaktív viselkedészavar kialakulása között [46,47]. HCB expozíciós források közelében dolgozó munkások körében [48], és HCB expozíciónak kísérletesen kitett patkánykísérletekben [49] idegi károsodást és központi idegrendszeri működészavarokat írtak le.

A porphyria turcicában szenvedő betegekben a szkizofrénia és/vagy a hipokondria gyakorisága megnövekedett [48]. Humán esetekben leírtak HCB expozíció indukált rángásokat, tremort, mentális dezorientációt, gyengeséget, paresztéziákat, epileptiform görcsöket [44].

1.3.3.3. Klórbenzolok agresszióra és/vagy szorongásra gyakorolt hatásai

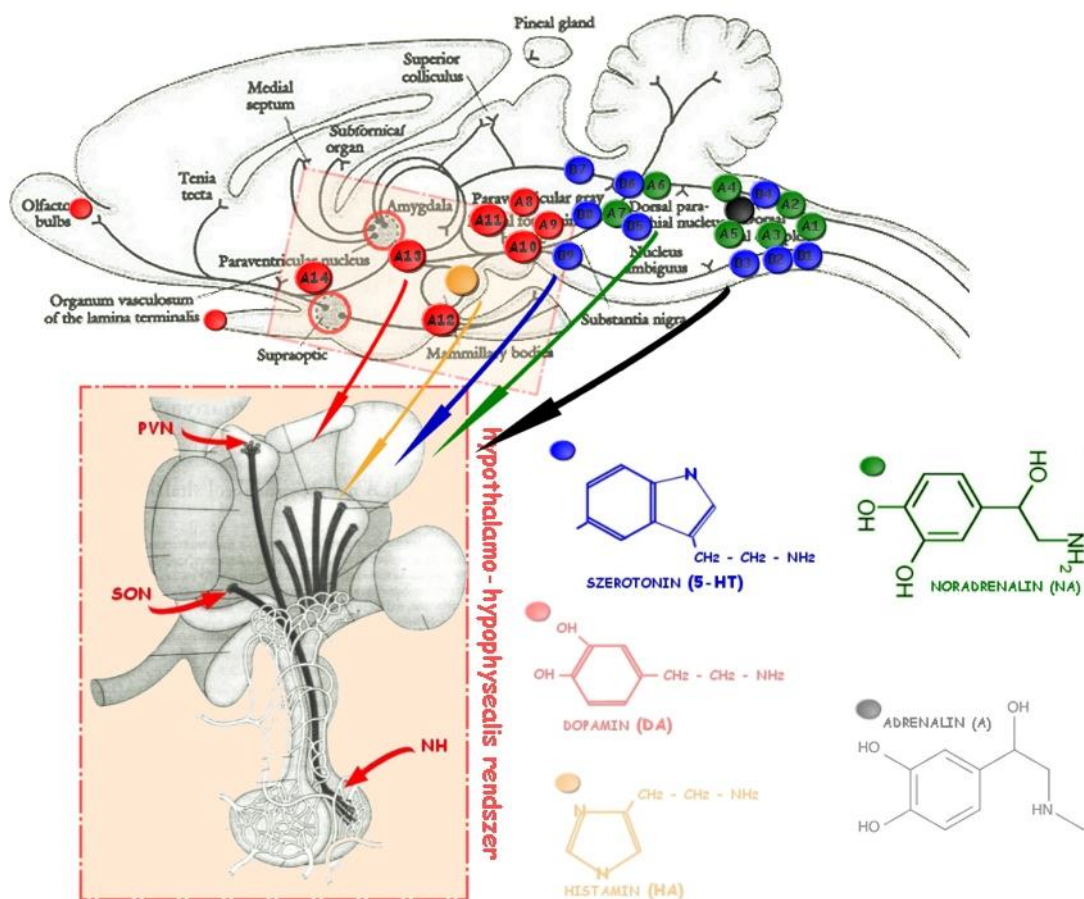
Kevés kísérletes adat áll rendelkezésre a HCB anxiatással és agresszióval kapcsolatos, valamint az ezek hátterében álló központi idegrendszeri mechanizmusok tisztázására vonatkozóan. Krónikus HCB expozíciók agresszióra és az érintett agyi monoaminerg rendszerekre gyakorolt hatását menyétekben és nyércekben vizsgálták [41]. Krónikus HCB expozíciót követően a nagyobb dózisokat kapott állatok egy része a kísérleti protokoll befejezése előtt elpusztult, de ezt megelőzően a nőstény állatok fokozott agressziót és ingerlénységet mutattak. A hipotalamuszban mért szerotonin (5-HT) koncentráció a nyércekben szignifikánsan megemelkedett. Egy másik kísérletsorozatban rövidebb idejű, de nagyobb dózisú, krónikus HCB expozíciókat követően az egyedek egy részében enyhe agressziót és hiperexcitabilitást figyeltek meg. A nőstény állatok hipotalamuszában emelkedett 5-HT koncentrációt mértek ebben az esetben is. Szignifikáns 5-HT emelkedést

figyeltek meg más agyi területeken a cerebellumban, cerebrális hemiszfériumokban és a középgyban. A noradrenalin (NA) szint szignifikánsan emelkedett a hipotalamuszban, valamint a cerebellum és a középgy egyes területein [41].

1.4. Viselkedéselemek és monoaminerg pályarendszerek

A monoaminerg pályarendszerek a vegetatív funkciók (pl. kardiovaszkuláris reguláció, táplálékfelvétel szabályozása, hőszabályozás, cirkadián ritmus stb.) és a viselkedésmintázatok kialakulásában (pl. agresszió, szorongás) és szabályozásában játszanak szerepet. A homeosztázis fenntartását a hipotalamo-hipofízális rendszerrel kooperáló monoaminreguláció a megfelelő fiziológias folyamatokkal és/vagy viselkedési elemekkel együttesen biztosítja [50, 51].

A monoaminok közül a katekolaminok csoportjába tartozó dopamin (DA), noradrenalin (NA) és adrenalin (A) neurotranszmitterként és hormonként egyaránt fontos szerepet tölt be. A szintén monoamin 5-HT az indolaminok szűkebb csoportjába tartozik. A katekolaminerg és szerotoninerg (5-HT-erg) magok kaudálistól rostrális irányba haladva 29 magcsoportba sorolhatók. Immun hisztokémiai és citokémiai vizsgálatok alapján a központi idegrendszerben A1-A17-ig a NA és a DA, B1-B9-ig az 5-HT, és C1-C3-ig az A tartalmú magokat jelölik [52].



3. ábra - Hypotalamo-hipofízális rendszer és a monoaminerg pályarendszerek kapcsolata

SON: supraopticus nucleus, PVN: paraventricularis nucleus, NH: neurohipofízis

B1-B9 magok: 5-HT-erg magcsoportok, A1-A7 magok: NA-erg magcsoportok

1.4.1. A szerotonin (5-HT) és pályarendszerei

A szerotonin az agyban szinte mindenhol jelenlevő neurotranszmitter, amely meghatározó szerepet tölt be a vegetatív funkciók szabályozásában (cirkadián ritmus, alvás-ébrenlét, táplálkozás, testsúly, kardiovaszkuláris szabályozás, hőszabályozás), a hangulati élet (depresszió, szorongás) és a különböző viselkedési mintázatok (szexuális, táplálkozási, szociális) kialakulásában, valamint az impulzus kontroll (agresszió) fenntartásában és regulálásában [52; 61].

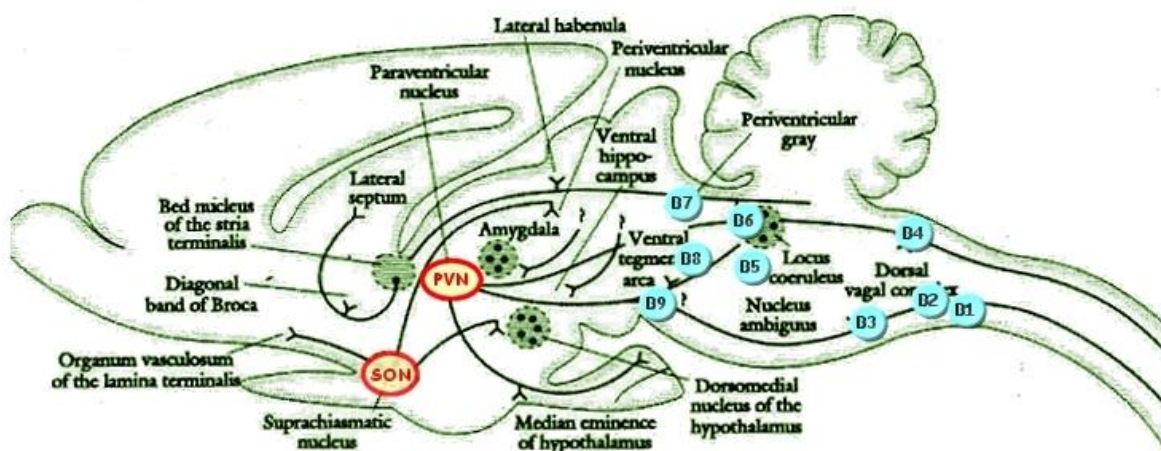
Perifériásan az 5-HT megtalálható a trombocitákban, az erek falában, a szívben, a gastrointestinalis rendszer enterokromaffin sejtjeiben és a tüdőben is. A központi idegrendszeren kívül az 5-HT a simaizom sejtekre is kifejti hatását [50].

1.4.1.1. Központi idegrendszeri szerotoninerg rendszerek

B1-B3-mal jelölik a nyúltvelőt, B4-B6-tal a híd, B7-B9-cel a középagygi raphe magokat. A B1-B6 magok viszonylag kevés sejtet tartalmaznak, elsősorban a gerincvelőt és az agytörzset látják el 5-HT-erg rostokkal. Legnagyobb a középagyban található B7-es (dorzális raphe mag), és a B8-as magcsoport (mediális raphe mag). A B9-es mag a ventrolaterális tegmentumban található (nucleus interpeduncularis). A B7-B9 neuronokból az előagy felé futó rostok a mediális előagy kötegen keresztül jutnak el rendeltetési helyükhöz. Beidegzik a substantia nigrát, a locus coeruleust (LC) (B7-es mag), a neocortexet (B7 és B8 mag), a limbikus rendszer elemei közül az amygdalát, a hippocampust (B7 és B8 mag), a septumot (B8 mag), a geniculatum ventrolateralét, a bulbus olfactoriust, valamint a thalamust és a hipotalamuszt [50, 52, 62, 63].

A 5-HT két lépésben szintetizálódik az L-triptofánból [64]. Hét 5-HT-erg receptor-családot azonosítottak (5-HT₁₋₇). Az 5-HT receptorok, az 5-HT₃ kivételével, G proteinhez kapcsolt, hét transzmembrán egységet tartalmaznak. Az 5-HT₃ receptorok ligand kapcsolt ioncsatornák. Az 5-HT₁ receptoreszaládba (5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E}, 5-HT_{1F}) főként G_{i/o/z} fehérjéhez kapcsolt, az 5-HT₂ családba (5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT_{2C}) pedig G_{q/11} fehérjéhez kötődő receptorok tartoznak. Az összes többi G proteinhez kapcsolt 5-HT-erg receptoreszalád tagjainak hatását G_s fehérje közvetíti.

Az 5-HT-erg szinapszisban az 5-HT receptorok pre- és poszt-szinaptikusan is megtalálhatók. [63 - 67]. Az 5-HT lebontását a monoamin-oxidáz (MAO A és a MAO B) enzimek katalizálják, melyek közül a MAO A rendelkezik nagyobb affinitással az 5-HT-hoz, ezért elsősorban ezt az enzimet tartják 5-HT degradáció fő enzimének. Hatására 5-hidroxi-indol-acetaldehid majd 5-hidroxi-indolecetsav (5-HIAA) keletkezik [64].



4. ábra Fontosabb szerotoninerg központok és projekcióik

SON: nucleus supraopticus, PVN: nucleus paraventricularis, B1-B9 magok: 5-HT-erg magcsoportok

1.4.1.2. A hipotalamusz és hipofízis szerotoninerg rendszerei

A hipotalamusz és a hipofízis főként a B7 és a B8 5-HT-erg magokból kapja a beidegzését. A B7 magból a nucleus supraopticusba (SON), a nucleus suprachiasmaticusba (SCN) és a nucleus paraventricularisba (PVN) vetülnek az idegrostok, a B8 mag pedig a PVN-on kívül a hipofízis elülső lebenyének beidegzéséért is felel. A PVN-ba beérkező rostok főként a parvocellularis részbe vetülnek [50] (4. ábra).

A 5-HT receptorok megtalálhatók mind a PVN-ban, mind a SON-ban. A centrális 5-HT kezelés arginin-vazopresszin (AVP) felszabadulást eredményez a PVN-ban. Az 5-HT_{2A}, és az 5-HT_{2C}, valamint az 5-HT_{1A} és az 5-HT_{1B} receptor agonisták megnövelik az AVP mRNS mennyiségét a PVN-ban, a SON-ban azonban ilyen hatás nem tapasztalható. A perifériás AVP felszabadulást főként az 5-HT_{2C}, 5-HT₄ és az 5-HT₇ receptorok mediálják. A stressz-indukált AVP válaszokban az 5-HT_{2A} és az 5-HT_{2C} receptorok játszanak szerepet [50].

Az 5-HT az 5-HT_{2A}, 5-HT_{2C}, 5-HT_{1A} és az 5-HT_{1B} receptorokon keresztül képes megnövelni az oxytocin (OT) génexpresszióját a SON-ban és a PVN-ban. A perifériás OT felszabadulást főként az 5-HT_{1A}, 5-HT_{2C} és az 5-HT₄ receptorok mediálják, de feltételezhető továbbá az 5-HT_{1B}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{5A} és az 5-HT₇ receptorok szerepe is. Az AVP-hez hasonlóan a stressz-indukált OT választ is az 5-HT_{2A} és az 5-HT_{2C} receptorok közvetítik [58].

1.4.1.3. A szerotonin szerepe a szorongásban és az agresszióban

Akut vagy krónikus 5-HT, vagy 5-HT agonista kezelés a gerincesek számos fajában gátolja az agressziót [68]. A vonatkozó irodalmi adatok szerint azonban csak a tartósan emelkedett agyi 5-HT szint képes csökkenteni az agresszív viselkedést [68]. A krónikus stressz, a megnövekedett L-triptofán kínálattal fokozódó 5-HT szintézis, vagy a szelektív szerotonin visszavételt gátló szerek (SSRI) használata tartósan emelkedett 5-HT szintet okoznak. Ez a szomatodendritikus 5-HT autoreceptorok down regulációját okozza, aminek a terminális agyi területeken bekövetkező elhúzódó 5HT neurotransmisszió a következménye [69].

Az agressziót szabályozó körben, a laterális septum, a nucleus accumbens, a striatum, a mediális amygdala, az elülső hipotalamusz, a raphe magok és a LC területén az 5-HT szintje fordított arányosságban állt az agresszióval [70 – 72].

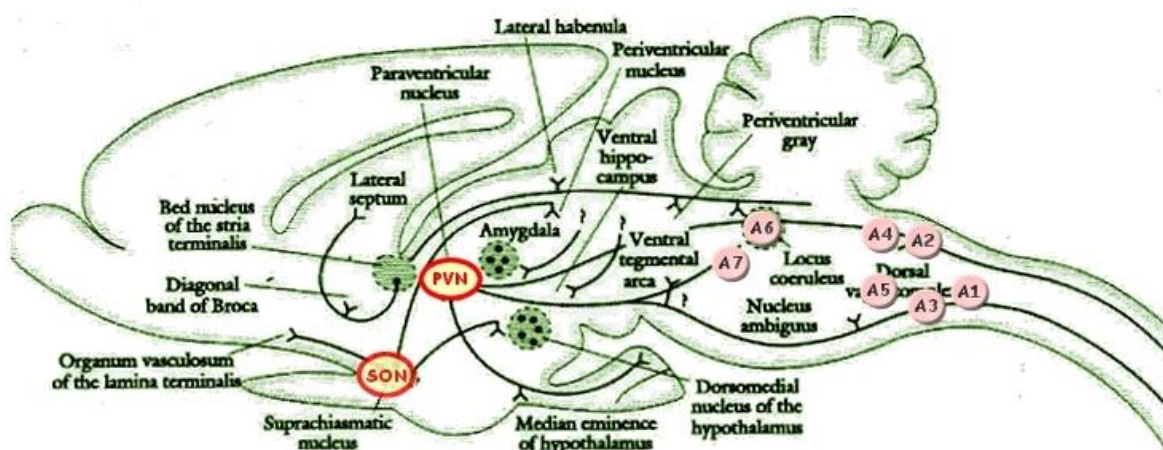
1.4.2. Noradrenalin (NA) és pályarendszerei

A NA a szimpatikus idegrendszer elsődleges neurotranszmittere a periférián, ugyanakkor számos helyen kimutatható a központi idegrendszerben. Jelentős szerepet játszik az alvás-ébrenléti ciklusban, az arousal szintjének meghatározásában, az éberségben, a menekülési és megküzdési reakciókban [52], az izgatottságban, a szorongásban [73], az érzelmek szintjének kialakításában, a depresszióban [74, 75] és az agresszív viselkedésben.[70, 76, 77].

A periférián a NA a szimpatikus innervációnak megfelelően fejt ki hatását a szimpatikus ganglionokban, a kardiovaszkuláris, a respiratorikus, a gasztrointestinális, az urogenitális rendszer simaizom elemein és a pupillomotoros rostokon. Hatással van a mirigyszekréciós működésekre, valamint a szénhidrát- és a lipidanyagcserére is [78].

1.4.2.1. Központi idegrendszeri noradrenerg rendszerek

A nyúltvelőben található A1-A3-as magok és a híd területén lévő A4-A7-es magok NA-t tartalmaznak. Az A5-A7 magokból eredő neuronok egy része a gerincvelőbe vetül. Az A4-A7 magok közül a legfontosabb a negyedik agykamra alján elhelyezkedő A6-os mag, a LC, mely az egész előagyat ellátja noradrenerg (NA-erg) rostokkal. A kisagyban, valamint a mediális előagyi köteghez csatlakozó rostok közvetítésével a mesencephalonban, a neokortexben, a hippocampusban, a thalamusban, a hipotalamuszban is van kapcsolat. Ezek a pályák, többek között a kognitív funkciókban és a neuroendokrin válaszban is szerepet játszanak [52, 79, 80].



5. ábra - Fontosabb noradrenerg központok és projekcióik

SON: nucleus supraopticus, PVN: nucleus paraventricularis, A1-A7 magok: NA-erg magcsoportok

A NA az L-tirozin aminosav L-DOPA-vá, majd DA-ná való átalakulását követően a dopamin- β -hidroxiláz enzim segítségével termelődik [81]. A NA-erg receptorok között megkülönböztetünk alfa (α_1 és α_2) és béta (β_1 , β_2 és β_3) receptorokat [82]. A posztzinaptikus β adrenerg (A-erg) receptorok G_s fehérjéhez kötöttek, aktiválódásuk E-adenilát-cikláz stimulációhoz vezet. Az α_2 A-erg receptorok mind pre-, mind posztzinaptikusan megtalálhatók, és/vagy az adenilát-cikláz aktivitás csökkentésével, vagy G_i és/vagy G_o fehérjéhez kötöttek specifikus K^+ csatornák aktiválásán keresztül továbbítják a ligand hatásait [83]. Az α_1 receptorok posztzinaptikusan helyezkednek el és a G_x fehérjén keresztül foszfolipáz aktivációt hoznak létre. A NA hatás a periférián és a központi idegrendszerben lévő α és β A-erg receptorok aktiválódásának egyensúlyától függ. A szinaptikus terminálisokon lévő NA transzporter tároló vezikulákba veszi fel a szinaptikus részbe került NA-t. A vezikulákba fel nem vett, citoszolban lévő NA a MAO és a katekol-O-metiltranszferáz (COMT) segítségével deaktiválódik [81].

1.4.2.2. A hipotalamusz noradrenerg rendszere

A hipotalamikus PVN NA-erg beidegzése az A1-es, az A2-es sejtcsoportból és az A6-os magból (LC) származik [84, 86]. A hipotalamusz PVN-a és az A6-os mag NA-erg neuronjai között reciprok idegi kapcsolat áll fenn [82].

Az 5-HT-erg receptorokhoz hasonlóan NA-erg receptorok is kimutathatóak a SON és a PVN neuronjain. A NA serkentő hatással van mind az OT, mind az AVP szekrécióra. A hormon felszabadulás befolyásolásán kívül a NA fokozza az OT és AVP mRNS expressziót a PVN-ban és a SON-ban [87, 88].

1.4.2.3. A noradrenalin szerepe a szorongásban és az agresszióban

Szorongásban és generalizált szorongásos zavarban csökkent NA-erg receptor szenzitivitást és fokozott NA-erg turn-over-t mutattak ki [89, 90]. Kísérleti állatokban, egészséges felnőttekben [91, 92], depressziós, valamint mániás betegekben összefüggést figyeltek meg a fokozott NA felszabadulás és az agresszió között [93, 94]. Állatmodellekben a NA fokozza az agresszív viselkedést, a β -A-erg receptor blokkolók pedig csökkentik az agresszív megnyilvánulásokat [93, 95]. Az agresszióval járó személyiségzavarokban a NA, valamint a NA metabolitok és az agresszió között pozitív korrelációt mutattak ki [96- 98].

1.5. A hipotalamo-neurohipofízeális rendszer

A hipotalamusz irányító szerepet játszik az élőlény külső és belső környezetéből származó ingerekre adott hormonális válaszok megjelenésében és más szabályozó központokon keresztül a motoros reakciókban. Meghatározó szabályozó központ a hipofízis elülső és hátulsó lebenye, a cerebrális cortex, az agytörzs és a gerincvelő premotoros és motoros neuronjai, valamint az autonóm preganglionáris neuronok [99, 100]. A hipotalamo-neurohipofízeális rendszer nagyméretű, 20-40 µm átmérőjű sejteket tartalmaz, melyek a SON-ban és a PVN-ban helyezkednek el [99]. A PVN-t két régióra oszthatjuk: laterális és mediális alegységekre. A magnocellularis neuronok a SON-ban és a PVN-ban tömörülnek, ahol az OT és az AVP szintéziséért felelős neuronális sejtestek találhatók. A hipotalamusz magnocelluláris magjaiból a hipofízis hátulsó lebenyébe érkező axonokból neurohormonok szabadulnak fel [101, 102]. Az axonterminálisok szoros kapcsolatban állnak a kapilláris plexussal és OT-t, AVP-t szekretálnak a hipofízeális vénákba és a keringésbe [103]. A parvocellularis OT és AVP termelő neuronok sejtestei kisebbek és axonjaik az eminentia medianához, az agytörzsbe, limbikus és olfaktorikus területekre vetülnek [104, - 106].

1.5.1. Arginin-Vazopresszin (AVP) és pályarendszerei

Az AVP fontos szerepet játszik homeosztatikus funkciók (ozmoreguláció, térfogatszabályozás, testhőmérséklet, kardiovaszkuláris szabályozás) regulálásában [107 - 110]. Az AVP felszabadulás szempontjából a legfőbb kiváltó inger a hiperozmolaritás, a hipovolémia és a stressz [111- 113]. Az AVP a hipotalamo-hipofízeális-mellékvesekéreg tengely szabályozásában is részt vesz, mert a hipofízis elülső lebenyében fokozza a corticotrop-releasing hormon (CRH) indukálta adrenocorticotrop hormon (ACTH) szekréciót is [114 - 116]. *In vitro* kísérleti adatok szerint adenohipofízis sejtkultúrákban a VP direkt adása serkenti a spontán ACTH felszabadulást [117].

1.5.1.1. Központi idegrendszeri arginin-vazopresszinerg (AVP-erg) rendszerek

Az AVP a központi idegrendszerben elsősorban a SON-ban, a PVN-ban és a SCN-ban szintetizálódik [114, 118- 121]. A PVN-ból vazopresszinerg (VP-erg) rostok futnak a laterális septum és az amygdala felé. VP-erg terminálisok találhatók ezen kívül a stria terminalis, a SCN, a septalis area, a medialis amygdala és a LC területén is [122, 123].

Az AVP axonális transzporttal, szekretoros granulumokon keresztül jut le a hipotalamuszból a hipofízis hátulsó lebenyébe [124]. Az AVP hatásait a V_{1a}, V_{1b} (V₃) és V₂ receptorokon

keresztül fejt ki. A V_{1a} és V_{1b} receptorkötődés hatására aktiválódik a receptorhoz kapcsolt $G_{q/11}$ protein. A V_2 receptor G_s proteinhez kötött, amely adenilát-cikláz enzimaktiválódást hoz létre [125] és az antidiuretikus hatást közvetíti a vesében.

1.5.1.2. Az arginin-vazopresszin szerepe a szorongásban és az agresszióban

Az AVP a már ismert szomatikus hatásain kívül fontos szerepet játszik a viselkedési mintázatok megjelenésében. Az eddigi kutatások alapján szerepe lehet az elkerülő magatartásban, a memóriában, a tanulásban, a stresszre adott válaszban, a szociális magatartásformákban (paternális viselkedés, szociális felismerés, agresszió, affiliáció, kötődés), szorongásos viselkedésben és depresszióban [126, 127]. A szorongásos viselkedésben főként V_{1a} és V_{1b} receptorok által közvetített hatás dominál. Kutatási eredmények szerint a V_1 receptor antagonisták patkányokban növelték elevated plus maze (EPM) tesztben a nyitott karokban töltött idő hosszát, vagyis csökkentették a szorongást [128]. A ventralis pallidumban az emelkedett V_{1a} receptor expresszió fokozott anxiatással járt együtt [129]. Szorongásos kórképekben szenvedő betegekben megnövekedett AVP szintet mértek a plazmában és/vagy a cerebrospinalis folyadékban (CSF). [130]. A V_{1b} receptor knock-out egerekben csökkent agresszió és memóriavesztés figyelhető meg. [116, 130- 133]. Pozitív összefüggést mutattak ki a CSF AVP koncentrációja és a személyiségzavarban szenvedő betegek által elkövetett agresszív cselekmények között, és ez összefüggött az 5-HT-erg aktivitás emelkedésével [134]. Hasonló eredményt hoztak azok a kísérletek, amelyekben az ismeretlen fajtársakkal szemben fokozott agressziót mutató állatok anterior hipotalamuszában a VP-erg neuronjainak denzitása fokozott volt [135]. Ezzel ellentétben a V_{1b} receptor knock-out egerek ilyen agressziót nem mutattak [136].

1.5.2. Oxytocin (OT) és pályarendszerei

Az OT rendszer egyik elsődleges hatáshelye a női reprodukciós rendszer. A simaizom sejtek összehúzóását fokozza, ezért szerepe van a szülést megelőzően és a szülés során a megfelelő uterus kontrakciók elősegítésében, valamint az emlőben a laktáció beindításában és fenntartásában [137]. Az autokrin/parakrin OT hatás szerepet játszhat a megtermékenyítésben és a korai embrionális fejlődésben [138]. Férfiakban az OT két legfőbb funkciója a tubuli seminiferi kontraktilitásának szabályozása és a szteroid hormon szintézis befolyásolása. A herékben és a mellékherékben az OT autokrin/parakrin módon módosíthatja a szteroid anyagcserét [139]. A vesékben nonhipertenzív natriuretikus hatást fejt ki, ezáltal szerepe van az ozmoregulációban [140]. Ezen kívül megtalálható az emberi thymusban, a zsírsejteken

pedig inzulinszerű hatást okoz [141, 142]. Az AVP-nel együtt glukagont és inzulint szabadít fel a pancreasból [143]. A mellékvese kéreg- és velőrésszében is kimutatták a jelenlétét [144].

1.5.2.1. Központi idegrendszeri oxytocinerg rendszerek

A központi idegrendszerben az OT főként a SON-ban és a PVN-ban termelődik. A PVN-ból oxytocinerg (OT-erg) pályák futnak az agytörzs és a gerincvelő felé, továbbá OT tartalmú axonterminálisok mutathatók ki a stria terminalis és a medialis preopticus area területén [122]. A neuroszekretoros sejtekben az OT bioszintézisét az AVP-hez hasonlóan axonális transzport követi. A nonapeptidet tartalmazó large dense core vesiculák (LDCV) az axonterminálisokban tárolódnak és a megfelelő stimulusra kiürülnek.

A humán OT receptor 7 transzmembrán alegységet tartalmaz és $G_{q/11}$ α osztályú GTP kötő fehérjékhez kötődik, melyek másodlagos hírvivő rendszerek aktiválódásához vezetnek, ami végül az intracelluláris kalcium koncentráció növekedését eredményezi [145, 146].

1.5.2.2. Az oxytocin (OT) szerepe a szorongásban és az agresszióban

A centrális OT rendszer szerepét kimutatták a maternális viselkedésben, a lordózis kiváltásában, a tanulás és a memória gátlásában, a táplálkozási viselkedésben, a stressz által kiváltott viselkedésben, és a szorongással, valamint agresszióval járó állapotokban [147, 148]. Az OT a kötődési viselkedés, a bizalom kialakulásában is szerepet játszik [149- 151]. Általánosan elfogadott, hogy az OT csökkenti a szorongást. Intracerebro-ventrikuláris OT kezelésben részesült nőstény patkányok csökkent szorongást mutattak az EPM tesztben „mesterséges” cerebrospinális folyadékkal kezelt állatokkal összehasonlítva [152]. Akut és krónikus OT kezelés anxiolitikus hatásúnak bizonyult egerekben és patkányokban. A nőstény OT knock-out egerek fokozott szorongást mutattak [153]. Emberekben az intranasalis OT csökkenti a szorongást [154]. OT gén knock-out egerek fokozott agresszív viselkedést mutatnak, a CSF OT koncentrációja pedig fordított arányban áll az agresszióval [147]. Emberekben csökkenti az amygdala aktivitását [155], így hiánya ellenségességhez, félelemhez, bizalmatlansághoz vezet, melyek megfelelő alapot adhatnak az agresszió felszínre töréséhez.

2. Célkitűzés

Az ember, mint biológiai lény az evolúció során az adaptáció és akkomodáció révén - testi és mentális lehetőségeit kihasználva - alkalmassá vált a társadalmi szintén zajló evolúció megvalósítására. Az eddig ismert legmagasabb komplexitású evolúciós szintér az emberi társadalom, amelyben a szereplők kooperatív cselekvési mintázataikkal képesek a környezetet létezésükhöz megfelelően átalakítani. A társadalmi keretek között zajló emberi tevékenységek a földi környezet minden elemére és viszonyrendszerére hatással vannak. A XX. század második felében például egyre szélesebb körben terjedt el a kemizáció. Az előállított új vegyületek, anyagok kiválóan szolgálták az ember rövidtávú igényeit. A nagy kémiai stabilitású természetidegen anyagok (xenobiotikumok) a korábbiakban kialakult keretekhez képest megváltoztatták a biológiai organizmusok akkomodációs mintázatait. A fejlett társadalmakban törvényi szabályozással igyekeznek korlátozni e nem kívánt hatásokat. Egyes xenobiotikumokat már tiltó listára helyeztek, más esetekben a minimum expozíciós dózishatások kijelölésével próbálják a káros következményeket kivédeni. Az EDC hatású xenobiotikumok társadalmi hatásai a fenti szabályozókkal környezettudatos módon nem kezelhetők.

Kutatási célunk modellrendszerekkel a homeosztázis és a környezeti-adaptív-potenciál kapcsolatának tanulmányozása az EDC vegyületek hatására.

(1) Munkánk során az EDC vegyületek közül a halogénezett aromás szénhidrogének csoportjából a klórbenzolokat (CIB) *mint modellvegyületeket kívántuk vizsgálni azzal a céllal, hogy a reprezentált vegyületcsoporton keresztül hívjuk fel a figyelmet a veszélyre, amelyet a homeosztatisz rendszerek módosulása közvetíthet.* A CIB a mezőgazdaságban ma már tiltott szerek, bár egyes fejlődő országokban továbbra is használatban vannak. Ipari alkalmazásuk expozíciós korlátokkal (törvényi limitekkal) szabályozott. A CIB legstabilabb lipofil képviselője a hexaklórbenzol (HCB). Ennek a xenobiotikum csoportnak alacsonyabb klórszubsztituált, lipofil tulajdonságú származékai is jelen vannak a környezetünkben, amelyek kémiai reaktivitása magasabb a HCB-nál.

(2) Az élő organizmusokat általában több expozíciós ártalom, azaz stressz(hatás) éri egy időben, így *a kombinált kémiai terhelések által kiváltott hatások vizsgálatának tanulmányozására alkalmas kutatási protokoll kialakítását és standardizálását is célunknak tekintettük.* Kutatásainkban két klórbenzol származékot, a HCB és 1,2,4-triklórbenzol (TCB) kombinált hatásainak vizsgálati modellrendszerét kívántuk kidolgozni és standardizálni.

- (3) Vizsgálataink során *a kémiai expozíció modellezéséhez kívántunk olyan in vivo kezelési protokollt kidolgozni*, amellyel az akkomodációval fenntartott környezeti-adaptív-potenciál kapacitás megőrzésének értékelésére alkalmas adatokat tudunk nyerni.
- (4) Elsősorban *a neuroendokrin homeosztatikus szabályozási rendszerre kifejtett kombinált klórbenzol expozíciós hatások vizsgálatát kívántuk elvégezni* a stresszhormonok közül az OT, az AVP és az ACTH által mediált akkomodatív reguláció tanulmányozásával.
- (5) *A stresszhormonok kombinált expozíciós hatásokra kiváltható elválasztásának tanulmányozásához in vitro modellt kívántunk kialakítani*, amellyel a hormonfelszabadulási folyamatok standardizált követése is megvalósítható.
- (6) Különösen érdekes kérdésnek tekintettük - *a ClB expozíciós limitre vonatkozó törvényi szabályozásai miatt -, hogy az extrém alacsony dózisú kombinált klórbenzol terhelések indukálnak-e változásokat a stresszhormonok neuroendokrin szabályozási folyamataiban.*
- (7) A viselkedési mintázatokat döntően a neuroendokrin szabályozásban résztvevő hormonok és a sejtek között kommunikáló biogén aminok határozzák meg. Vizsgáltuk, hogy a ClB expozíciója *miként módosíthatja a biogén aminok (5-HT, NA) mediálta OT, AVP felszabadulást.*
- (8) Tanulmányozni kívántuk, hogy *a biogén aminok és hormonok közvetítette stresszválaszok megváltoztatják-e a gyors alkalmazkodási mintázatot, az állatok viselkedését.*
- (9) Célunk volt annak a kérdésnek a vizsgálata is, hogy *a jogszabályokban engedélyezett expozíciós dózisonál sokkal alacsonyabb dózisú kombinált klórbenzol kezelés okoz-e mérhető viselkedésbeli változásokat a kísérleti állatokban.*
- (10) Eredményeink értékelése során választ kerestünk arra, hogy a kutatási protokollok szerint a viselkedési mintázatokban és/vagy a neuroendokrin szabályozásban detektálható változások milyen homeosztatikus mechanizmusokkal hozhatók összefüggésbe.
- (11) Választ kerestünk arra is, hogy a ClB modellezett EDC vegyületek milyen további egészségügyi kockázatot jelenthetnek.
- (12) Kutatási eredményeink alapján vizsgálni kívántuk, hogy eltérő szabályozás vonatkozzon-e a deponálódó és nem deponálódó EDC vegyületekre.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Anyagok

Kísérleteink során felhasznált anyagokat a Sigma-Aldrich Corporation-től (*St. Louis, MO, USA*) vagy az Invitrogen Corporation-től (*Carlsbad, CA, USA*) vásároltuk. A sejt kultúra technikák során használt eszközöket (Petri csésze, plate, stb.) a BD-Biosciences-től (*San Jose, CA, USA*) szereztük be. A sejtek tenyésztéséhez 20 %-os (v/v) Foetal Calf Serum (FCS) szupplementált Dulbecco's Modified Essential Medium-ot (DMEM) alkalmaztunk, melyet 100 NE/ml penicillinnel és 100 NE/ml streptomycinnel egészítettünk ki. A sejt kultúrákat a tenyésztés és vizsgálatok során 37 °C-on, 5 %-os CO₂ tartalom mellett inkubáltuk.

3.2. Kísérleti állatok

A kísérletekhez hím (*a kísérletek kezdetén 180-350 g tömegű, 6-8 hetes*) Wistar (*Charles River, Isaszeg, Magyarország*) patkányokat használtunk. Az állatokat kontrollált körülmények (hőmérséklet, relatív páratartalom, fény/sötét periódus) mellett, 32x40x18 cm méretű ketrecekben tartottuk (ketrecenként maximum 4 állat). A kísérleti állatokat a 3.3 fejezetben ismertetett kezelési csoportokba soroltuk. Kisebb hím (*a kísérletek kezdetén 200-250 g, 4-6 hetes*) Wistar patkányokat elkülönítve, de azonos körülmények mellett tartottunk, és az agressziós tesztek során intruderként használtunk fel. Az állatok számára a táplálék (*CRLT/N, Charles River, Magyarország*) és ivóvíz *ad libitum* rendelkezésre állt. A kezeléseket az állatok két hetes, a körülményekhez és a kísérletekben részt vevő személyekhez való habituálódását követően indítottuk el. A vizsgálatokba bevont állatokkal végzett kutatásokat a Szegedi Tudományegyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottságának engedélyével, a laboratóriumi állatokra, valamint a kísérleti eljárásokra vonatkozó jogszabályok tiszteletben tartása mellett végeztük.

In vivo vizsgálati protokollok

3.3. Alkalmazott expozíciók és kísérleti csoportok

A kísérletek során az állatokat hexaklórbenzol és 1,2,4-triklórbenzol 1:1 arányú keverékével (CIB) kezeltük. A kísérletekhez előkísérletekkel adaptáltuk a biztonságos protokoll megtartásához szükséges kezelési (expozíciós stressz) sémát. A legjobb expozíciós protokollként a táplálkozási útvonalnak megfelelő kezelési séma bizonyult, melyet a gyomorszondával történő CIB bejuttatás biztosított. Így napi 1 µg/testsúly kg (továbbiakban

D2, D2-CIB kezelési csoportok) vagy 0,1 µg/testsúly kg dózisban (továbbiakban **D1, D1-CIB kezelési csoportok**), 1 ml végtérfogatban, 0, 30, 60 és 90 napon keresztül kezeltük a kísérleti állatokat. A kísérleti protokoll beállításakor több expozíciós útvonal kipróbálása után, a csecsemő gasztrikus szonda alkalmazásával standardizáltuk a vizsgálatot. A kezelési protokoll standardizálásakor a vizsgálatokhoz a következő csoportokat alakítottuk ki:

1. CIB kezelt csoportok: 30 (n=5-5, D1- vagy D2-CIB-30 csoport), 60 (n=5-5, D1- vagy D2-CIB-60 csoport) és 90 (n=5-5, D1- vagy D2-CIB-90 csoport) napos kombinált klórbenzol expozíciós csoport (10 állat/csoport/kísérletsorozat, 5 kísérletsorozatban), melyeket az irodalom által is leggyakoribb expozíciós úton, táplálkozási séma szerint, gasztrikus szondával kezeltünk.

2. Stressz kontroll csoportok: (SC) 0, 30 (n=10, SC-30 csoport), 60 (n=10, SC-60 csoport) és 90 (n=10, SC-90 csoport) napon át üres gyomorszonda lebocsátásával kezelt/stresszelt állatok.

3. Abszolút kontroll csoport: (kontroll) kezeletlen/nem stresszelt állatok (n=10).

4. Pozitív kontroll csoport: (+C). az állatok a kezelési protokoll során, gyomorszondán át, 0, 30, 60 és 90 napon át a CIB szolvensét (0,001 ezrelékes etanol oldat) kapták az 1 ml-es végtérfogatban (n= 10).

5. Negatív kontroll csoport: (-C) a kezelési sémában gyomorszondán át, ismert anyagtartalmú ivóvizet kaptak a kísérleti állatok 1 ml végtérfogatban, 0, 30, 60, és 90 napig (n=10).

3.4. Kísérleti protokoll

Az állatokat a 3.3 fejezetben ismertetett csoportosítás szerint kezeltük 0, 30, 60 és 90 napig. A klórbenzol (CIB) kezeléseket követően a szorongást open field (OF) és elevated plus maze (EPM) tesztekkel, a hímek közötti agresszív viselkedést módosított resident-intruder (RI) tesztekkel vizsgáltuk.

A viselkedés-vizsgálatok után a kísérleti állatokból a dekapitálást követően (alvadásgátolt és natív) vérmintákat gyűjtöttünk. Ezekből a mintákból stresszhormonokat (ACTH, OT, VP) határoztunk meg RIA (radioimmuno assay) módszerrel. A szérumból a máj funkcionális állapotáról tájékoztató májtranszferáz enzim koncentrációkat – szérum glutamát-oxálacetát-transzamináz (SGOT), szérum glutamát-piruvát-transzamináz (SGPT) és gamma-glutamil-transzpeptidáz (GGT) – határoztunk meg, melyek a klórbenzol expozíciók toxicitásának igazolt] markere [156].

A kezelések során és/vagy a kezeléseket követően az adott kezelési sémához tartozó állatok testtömegét és fontosabb szerveinek tömegét (máj, lép, vese, mellékvese, stb.) is megmértük. A testtömeg-változásokból és a májenzimek koncentrációinak meghatározásából származó adatokkal igazoltuk az általunk alkalmazott klórbenzol dózisok (D1, D2) szubtoxikusságát. A kezelt patkányok hipofíziséből primer neurohipofízis (NH) és adenohipofízis (AdH) sejtkultúrákat készítettünk. A megfelelő korú in vitro monolayer kultúrák ACTH, VP, OT felszabadulás időkinetikáját követtük. Vizsgáltuk még a NH kultúrák 5-HT és NA receptorainak jelenlétét, valamint meghatároztuk a NH kultúrák 5-HT és/vagy NA mediált VP és OT elválasztását RIA módszerrel [157].

3.5. Viselkedés vizsgálatok

A kísérletek során minden állatot egyszer használtunk az egyes viselkedés-tesztekben. A teszteket azonos körülmények mellett (stressz szegény: pl. gyengén megvilágított helyiségben) végeztük. A teszteket 1 órás, a helyiséghez való habituációs időt követően indítottuk el. Az állatokat protokoll szerinti csoportbeosztásban, de véletlenszerű sorrendben vontuk be a vizsgálatokba. A kísérleti apparátust minden próba előtt 70 %-os (v/v) etanollal megtisztítottuk, hogy elimináljuk a keletkezett szagok állatra/viselkedésére gyakorolt esetleges hatásait. A vizsgálatokat teljes exikálódás után végeztük. A mutatott viselkedési elemeket a tesztapparátus felett, a mennyezetre erősített kamerával, illetve egy hozzá kapcsolt viselkedési szoftver: az *Ethovision* (v2.3, Noldus Information Technology, Wageningen, Hollandia) [158_164] segítségével rögzítettük.

3.5.1. *Open field* (OF) teszt

Az OF teszt egy standardizált módszer a rácsalókra jellemző lokomotoros aktivitás, felfedező viselkedés, kíváncsiság, szorongás és habituálódás vizsgálatára [159]. A kísérleti állatot egy felülről nyitott, szabványos méretű (45 cm magas, 80 cm átmérőjű, kör alakú) szürke, csúszásmentes padlójú üres aréna közepére helyezzük. A vizsgálat során a következő paraméterek kerültek megfigyelésre és rögzítésre a számítógép és/vagy a vizsgálatot/ utólagos ellenőrzéseket végző személyek által:

- az állat által a centrumban és perifériás zónában töltött idő,
- az állat mozgásának átlagsebessége,
- az állat által a mozgással eltöltött idő és a megtett út,
- az állat ágaskodásainak (rearing) frekvenciája és időtartama,
- a tisztálkodások száma,

- a vakarózások száma,
- a freezing-ek száma,
- a széklet (faeces) száma.

Az állatok viselkedését 5 percig vizsgáltuk.

3.5.2. *Elevated plus maze (EPM) teszt*

Az EPM teszt a rágszálók szorongásának vizsgálatára alkalmas standard eljárás [160, 161]. A tesztapparátus szabványos, standardizált rendszerű mind

- eszközében (közös, centrális területből kiinduló 4 db, egymásra merőleges, perifériás, egyenként 50 cm hosszú – két nyitott, oldalfal nélküli és két zárt, 8 cm szélességű karból – épül fel),
- és vizsgálati módszertanában.

Az apparátus alatti területet fekete anyaggal fedtük le, hogy csökkentsük a magasság észleléséből származó zavaró (félelemkeltő) tényezőket. Az állatot a kísérlet kezdetén a centrumba helyeztük, egy adott nyitott karral szemben. A vizsgálat során a következő paraméterek kerültek megfigyelésre a számítógép és/vagy a vizsgálatot/utólagos ellenőrzést végző személyek által:

- a nyitott és a zárt karokban töltött idő teljes tartama,
- az előnyben részesített (preferált) terület (a nyitott területen töltött idő és az apparátusban töltött idő aránya százalékban megadva),
- a zónákba történő belépések száma,
- az ágaskodás, tisztálkodás, szimatolás, freezing frekvenciája és időtartama.

Az állatok viselkedését 3 percig vizsgáltuk.

3.5.3. *Hímek közötti agresszivitás vizsgálata (RI teszt)*

Kísérleti protokollunkban az állatok agressziójának vizsgálatához módosított RI teszteket [162] végeztük. A resident (bentlakó) állatot forgáccsal borított területre helyeztük, majd 5 percig hagytuk habituálódni. A teszt ideje alatt rögzítettük a resident állatra jellemző lokomotoros/exploratív és a szorongásra utaló viselkedéselemeket. A habituációt követően, a kísérlet 6. percében az intruder (betolakodó) állatot a resident mellé helyeztük. Az állatok közötti interakció során a következő paraméterek időtartama és/vagy frekvenciája és/vagy latenciája került megfigyelésre a számítógép és/vagy a vizsgálatot/utólagos ellenőrzést végző személyek által:

1. a resident állatra jellemző lokomóció, felfedező magatartás, szaglászás, freezing, mosakodás mellső végtagokkal, vakarózás hátsó végtagokkal

2. szociális viselkedési formák: intruder állat mosdatása, naso-nasális és naso-genitális kapcsolatok

3. offenzív viselkedési formák: fenyegető testtartás (intruder állat fölé magasodás, rámászás, alacsonyabb pozícióba való kényszerítés), támadás (elsősorban a hát és nyaktájékon a bunda és a bőr harapása a fej gyors mozgásával, mellső végtagokkal való ütés, laterális irányú szurkálások, nyomások), a menekülő intruder állat gyors üldözése

4. defenzív viselkedési formák: védekező testtartás (intruder állat támadása ellen hátsó lábra állás vagy összekuporodás, távolságtartás lehetőségének keresése, megadási készség, menekülés).

Az állatok viselkedését 5 percig vizsgáltuk.

***In vitro* vizsgálatok**

3.6. Neurohipofízis (NH) monolayer sejtkultúrák

A különféle kezelési sémákba bevont állatokból preparáló mikroszkóp alatt, steril körülmények között eltávolítottuk a hipofízist, majd szeparáltuk a NH. A NH-ből a hártyák eltávolítása után történt a pituicyták szeparálása enzimatisz (30 perc, trypsin [0,2 %] és 60 perc, kollagenáz [50 µg/ml] és 60 perc, diszpáz [50 µg/ml] és 30 perc, DN-áz [30 µg/ml]), majd mechanikus (nejlon-blutex filter 80 µm Ø) úton. A sejtszuszpénziót DMEM + 20% FCS + 30U/ml Pen-Strep tápoldatba helyeztük, és meghatároztuk a sejtek viabilitását Trypan-blue tesztel (≥ 95 %). Ezután a sejtszuszpénzió koncentrációját 2×10^5 sejt/ml-re állítottuk be. A szuszpendált sejteket 5 % kollagénnel felületkezelte plasztik tenyésztőedényekbe helyeztük. A sejtkultúrákat a letapadást követően 3 naponként friss tápoldattal mostuk, amíg azok konfluenssé váltak. Ezután standardizáltuk a NH tenyészeteket, az OT és VP tartalom relatív gyakoriságának meghatározásával, valamint a specifikus és aspecifikus hormon elválasztás kiváltásával. A kapott eredmények 5-7%-nál nem nagyobb eltérését mutató mintákból képeztük a vizsgálati protokollok csoportjait [163].

3.6.1. A NH monolayer sejtkultúrák sejtfiziológiai követése

A monolayer NH tenyészeteket morfolometriai, sejttanszformációs viselkedés, energia transzfer, membránfunkciók tekintetében kontrolláltuk a [164]. László F. A. és mtsai által leírt

módszerek alapján. Ezzel igazoltuk az alkalmazott CIB dózisok citotoxikus hatásoktól való mentességét.

3.7. Adenohipofízis (AdH) monolayer sejtkultúrák

A különféle kezelési sémákba bevont Wistar patkányokból preparáló mikroszkóp alatt, steril körülmények mellett eltávolítottuk a hipofízist, majd az AdH-t. Az AdH-ről a hárttyákat eltávolítottuk, majd diszpergáltuk a sejteket enzimátikus / (30 perc, trypsin [0,2 %] és 40 perc, kollagenáz [50 µg/ml] és 40 perc, diszpáz [50 µg/ml] és 20 perc, DN-áz [30 µg/ml])/, majd mechanikus (nejlon-blutex filter 83 µm Ø) disszociáltatással. A kapott sejtuszuspenziót DMEM + 10% FCS + 10U/ml Pen-Strep tápoldatba helyeztük. Miután meghatároztuk a sejtek viabilitását Trypan-blue tesztel ($\geq 95\%$), a sejtuszuspenzió koncentrációját 2×10^5 sejt/ml-re állítottuk be. A szuszpendált sejteket 5 % kollagénnel felületkezelt plasztik tenyésztőedényekbe helyeztük. A sejteket a letapadást követően 3-5 naponként friss tápoldattal mostuk, azok konfluenssé válásáig. Ezt követően ACTH elválasztásra standardizáltuk a tenyészeteket, e funkció relatív gyakoriságának meghatározásával, valamint specifikus (arginin-vazopresszin) és aspecifikus (30 mM kálium) stimulációval. A kapott ACTH szekréció 5–7%-nál nem nagyobb eltérését mutató mintákból képeztük a kutatási csoportokat [165].

3.7.1. Az AdH monolayer sejtkultúrák sejtфизиológiai követése

A monolayer AdH tenyészeteket morfolometriai, sejttranszformációs tulajdonságok, energia transzfer, membránfunkciók tekintetében, kontrolláltuk a [166, 167] leírt módszerek alapján. Ezzel igazoltuk, hogy kísérleti protokollunk a citotoxicitást jelző hatásoktól mentes az alkalmazott CIB dózisoknál [168, 169].

3.8. *In vitro* vizsgálatok

A monolayer AdH és NH sejtkultúrák felülúszó médiumait FCS mentes fiziológias tápoldatra cseréltük (DMEM), majd 37 °C-on 5% CO₂-t tartalmazó légtérben tartottuk a kultúrákat. Az *in vitro* kísérleti protokoll 0, 5, 10, 20, 30, 60, 120 perces időpontjaiban mintákat vettünk speciális műanyaga csövekbe, melyeket azonnal -70 °C-ra tettünk. Az összegyűjtött mintákból RIA vagy LIA módszerekkel AdH kultúrákból ACTH-t, NH kultúrákból OT, VP hormonokat határoztunk meg. Az alap hormonfelszabadulás kinetika felvétele után, a tenyészeteket ismét mostuk, majd 12 órán át fiziológias körülmények között tartottuk. Ezután 30mM Kálium

indukcióval aspecifikus felszabadulási kinetikát határoztunk meg [163_171], majd a mosást követő 12 órás nyugalmi fázis után ACTH elválasztást arginin-vazopresszinnel, VP elválasztást dopaminnal, OT elválasztást hisztaminnal, mint specifikus ágensekkel indukáltunk. A hormonelválasztás kinetikáit is detektáltuk.

3.9. NH monoamin receptor vizsgálatok

A kialakított és standardizált kísérleti körülmények mellett először a tenyészeteket mostuk, majd a kultúrákat 120 percig inkubáltuk. Az inkubációt követően a felülúszókból mintát vettünk az alap VP/OT szintek meghatározására, melyeket RIA módszerrel való méréséig -70 °C-on tároltuk. A kísérleti (kontrollok és klórbenzol kezelt) állatokból nyert konfluens kultúrákat *in vitro* 60 percig inkubáltuk 10^{-6} M koncentrációban 5-HT-nal vagy NA-nal. A kezelési időtartamok végén a sejtkultúrák kondicionált médiumait begyűjtöttük, -70 °C-on lefagyasztottuk, majd a későbbiekben RIA módszerrel meghatároztuk a szekretált VP és OT koncentrációkat.

3.10. Hormon mérések

3.10.1. AVP, OT és ACTH meghatározás felülúszó médiumból

A NH sejtkultúrák felülúszó médiumaiból a VP/OT szintek meghatározásához alkalmazott protokollokat az irodalom szerint használtuk [163]. A médiumok a mintavételt megelőzően, a sejtkultúrák kezelési sémái szerint voltak kondicionálva. A sejtkultúrákról a felülúszót eltávolítottuk, majd a mérés kezdetéig -70 °C-on tároltuk. A mintákból módosított RIA módszerrel [170] történt a VP [170] vagy OT [172] meghatározása. Az alkalmazott assay mérési tartománya a standard görbék alapján 1-128pg VP/OT. A módszer VP/OT érzékenysége 1 pg/assay cső volt. A minták fehérjetartalmát módosított Lowry módszer szerint [173] határoztuk meg. Eredményeinket mg fehérjetartalomra vonatkoztatva adtuk meg.

Az ACTH meghatározása LIA módszerrel zajlott, az SZTE ÁOK I. sz. Belgyógyászati Klinika Endokrinológiai Osztály mérőberendezésének alkalmazásával (*Immulite 2000, Siemens Healthcare Diagnostic, Deerfield, IL, USA, és DPC kit [174]*).

3.10.2. AVP, OT és ACTH meghatározása szérumból

A kísérleti állatokból, a dekapitációt követően EDTA-t tartalmazó polisztrén csövekbe gyűjtöttük a vérmintákat. A csöveket lecentrifugáltuk (4 °C, 8000 rpm, 10 perc), majd a

plazmát leszívtuk és -70 °C-on tároltuk a mérésekig. A szérumból VP/OT/ACTH szintek RIA-al való meghatározását a korábban már (3.10.1. fejezet) említett módszerekkel végeztük.

3.11. Statisztikai analízis

Eredményeinket SPSS 13.0 for Windows (*SPSS Incorporation, Chicago, IL, USA*) statisztikai programcsomagot használva analizáltuk. A viselkedési tesztekéből származó adatokat az eloszlások vizsgálatát követően ANOVA módszerrel és Fisher-féle LSD post hoc eljárással (OF, EPM esetén), vagy Kruskal-Wallis nem-paraméteres módszerrel, Mann-Whitney U-tesztet (RI) alkalmazva dolgoztuk fel. A szérumból és a receptor vizsgálatokból származó mért adatainkat ANOVA módszerrel és Fisher-féle LSD post hoc eljárással elemeztük. Eredményeinket $\text{mean} \pm \text{standard error of mean (SEM)}$ formában tüntettük fel az eredmények fejezetben. Az alkalmazott tesztek szignifikancia szintje $p < 0,05$ volt.

4. Eredmények

4.1. Alkalmazott kontrollrendszer

A feltüntetett *in vivo* vizsgálati paramétereinkben nem tapasztaltunk szignifikáns különbségeket a kísérletek során alkalmazott kontrollrendszerben. Nem mutatott szignifikáns eltérést az abszolút **kontroll**ként kezelt állatcsoport eredményeitől a **SC**, a **+C** és a **-C** csoportként kezelt állatok májenzim, testtömeg, szervtömeg változása, szérum hormontartalma, viselkedési-elem vizsgálatai eredménye. Ezért az eredmények prezentálásakor az 1. táblázatban és a 6-12. számú eredményábrákon csak az abszolút **kontroll** állatok paramétereit tüntettük fel. A jelölt statisztikai különbségeket - hacsak külön nem említjük - a kezeletlen (abszolút) kontrollokhoz viszonyítva adtuk meg. A könnyebb adatkövetés érdekében a stressz, a pozitív, a negatív kontroll állatok vonatkozó eredményeit az eredményábrákon nem tüntettük fel.

4.2. Kombinált klórbenzol expozíciók toxicitási vizsgálatainak eredményei

Az alkalmazott klórbenzol expozíciók (D1 és D2 dózisok) toxicitásának meghatározásához a kísérletek során és/vagy a kísérletek végén testtömeg, valamint szérum SGOT, SGPT és GGT értékeket mértünk. A kombinált klórbenzol expozíciók a testtömeget és májenzimeket nem módosították szignifikáns módon egyik kezelési csoport esetén sem. Jelen munkában a nagyobb (D2: 1 µg/tskg/nap) kombinált klórbenzol dózissal kezelt állatok testtömeg és májenzimekre vonatkozó eredményei láthatók, amelyeknél szignifikánsan diszkrétebb eredményeket képeztek a D2 dóziskísérletek hasonló paramétereit. /A testtömeg alakulása ($F_{3,16}=0,769$, $P=0,528$): a kontroll állatok ($554,20 \pm 12,83$ g) és a klórbenzollal kezelt állatok D2-ClB-30 ($517,80 \pm 27,28$ g, $p=0,314$) D2-ClB-60 ($555,20 \pm 35,27$ g, $p=0,978$) és D2-ClB-90 ($516,40 \pm 17,32$ g, $p=0,296$) esetén./

A vérminták szérumaiból mért transzferáz enzimek koncentráció értékeiben történt változásokat az 1. táblázat tünteti fel. Ebben a táblázatban is csak a nagyobb (D2, 1 µg/tskg/nap) dózisú klórbenzol expozíciók májenzimekre gyakorolt hatásai kerültek megjelenítésre, a fent leírt indokok miatt.

normál értékek	kísérleti csoportok (NE/I)			
	kontroll	D2-ClB-30	D2-ClB-60	D2-ClB-90

SGOT	30 – 250	127,88±2,83	146,46±2,03 ^A	155,16±3,98 ^B	125,68±3,57
SGPT	50 – 200	54,55±2,09	57,86±1,94	58,30±1,57	50,82±2,26
GGT	2 – 20	3,44±0,07	3,91±0,09	4,37±0,58 ^A	3,67±0,07

1. Táblázat - A klórbenzol expozíciók hatása a toxicitást jelző szérumban májenzim koncentrációkra

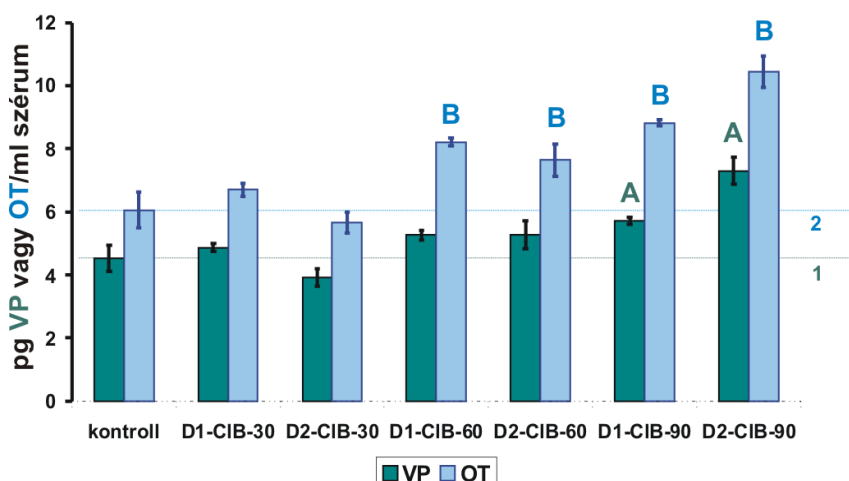
átlag±SEM, n=10/kontroll vagy n=10/CIB kezelt csoportok. Az eredményeket NE/l mértékegységben tüntettük fel. Az adatokat ANOVA módszerrel, LSD post hoc teszttel elemeztük, és a szignifikancia értékeit (**A:** $p < 0,05$, **B:** $p < 0,001$) a kontrollokhoz képest adtuk meg. Az irodalmi adatok alapján megadott (szubtoxikus) expozíciók esetén megjelölt értékeket (minimum, maximum) „normál tartomány” megnevezéssel jelöltük.

A kombinált klórbenzol expozíciók diszkrét változásokat indukáltak a SGOT ($F_{3,16}=20,161$, $P=1,104 \times 10^{-5}$; 127,88±2,834 NE/l vs 146,46±2,03 NE/l, $p=0,001$; 155,16±3,98 NE/l, $p < 0,001$; 125,68±3,57 NE/l, $p=0,633$), az SGPT ($F_{3,16}=3,038$, $P=0,060$; 54,55±2,09 NE/l vs 57,86±1,94 NE/l, $p=0,257$; 58,3±1,570 NE/l, $p=0,202$; 50,82±2,26 NE/l, $p=0,204$), és a GGT ($F_{3,16}=1,745$, $P=0,198$; 3,44±0,072 NE/l vs 3,91±0,096 NE/l, $p=0,290$; 4,37±0,586 NE/l, $p=0,044$; 3,67±0,069 NE/l, $p=0,596$) értékekben. Viszont a mért enzimkoncentrációk a kezelések során az irodalmi adatok szerinti (1. táblázat) szubtoxikus tartományban maradtak. A fontosabb szervek (máj, vese, lép, mellékvese) tömegét megmértük, de nem találtunk szignifikáns eltérést az egyes kísérleti protokoll szerinti csoportok között. Az állatokon/szerveken nem tapasztaltunk külső eltéréseket, malformációkat, vagy esetleges toxicitásra utaló egyéb jeleket.

Eredményeink arra utalnak, hogy az alkalmazott D2 és így a kisebb D1 klórbenzol expozíciók is szubtoxikusak voltak.

4.3. Szérumban VP, OT és ACTH értékek

A kísérleti protokollnak megfelelően gyűjtött vérminták szérumból meghatároztuk a VP, az OT és az ACTH koncentrációkat. A klórbenzol expozíciók hatására kialakuló szérumban VP/OT változásokat a 6. ábrán tüntettük fel.



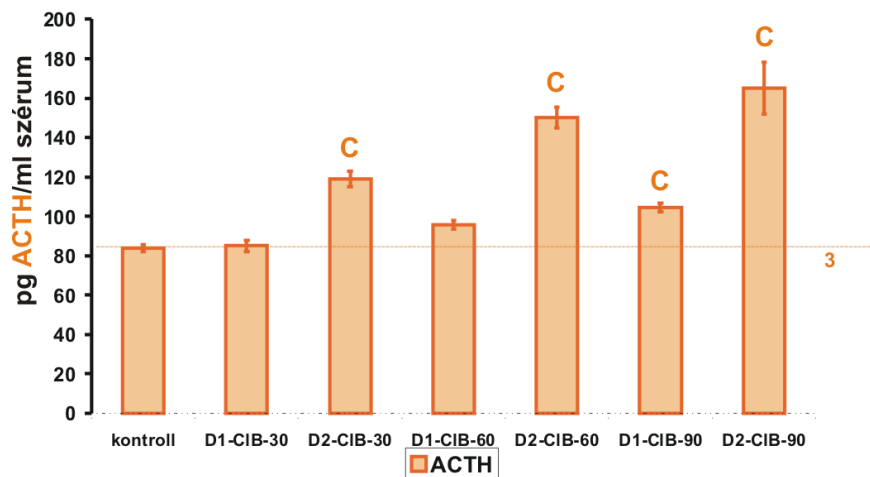
6. ábra – A szérumban vazopresszin (VP) és oxytocin (OT) koncentrációk

átlag±SEM, n=10/kísérleti csoport, az eredmények pg hormon/ml szérumban vannak megadva. A VP-hez (A: $p < 0,05$) vagy az OT-hoz (B: $p < 0,05$) rendelt szignifikancia értékeket ANOVA módszerrel, LSD post hoc teszttel kerültek kiértékelésre a kontroll csoport, valamint a 30, 60, és 90 napos, 0,1 µg/tskg (D1) és 1 µg/tskg (D2) dózisú kombinált klórbenzol expozíciónak kitett állatok között. Szérumban VP (zöld oszlopok), szérumban OT (kék oszlopok). A VP és az OT értékek közös y tengelyhez rendelték. Az könnyebb áttekinthetőség érdekében a kontroll csoportok alap VP elválasztás koncentrációját zöld, 1-es jelzésű; a bazális OT koncentrációját kék, 2-es jelzésű vonallal jelöltük.

Szignifikáns eltérések mutatkoztak a VP ($F_{6,28}=11,942$, $P=1,249 \times 10^{-6}$) és az OT ($F_{6,28}=19,421$, $P=8,453 \times 10^{-9}$) szérumban mért szintjeiben.

A VP a D1-ClB-30 ($4,86 \pm 0,11$ pg/ml, $p=0,447$), a D2-ClB-30 ($3,91 \pm 0,26$ pg/ml, $p=0,173$), a D1-ClB-60 ($5,25 \pm 0,15$ pg/ml, $p=0,105$), és a D2-ClB-60 ($5,26 \pm 0,44$ pg/ml, $p=0,102$), valamint az OT a D1-ClB-30 ($6,69 \pm 0,20$ pg/ml, $p=0,241$), és a D2-ClB-30 ($5,66 \pm 0,33$ pg/ml, $p=0,471$) csoportokban nem mutatott szignifikáns különbséget a kontroll VP ($4,52 \pm 0,41$ pg/ml) és a kontroll OT ($6,05 \pm 0,57$ pg/ml) szinthez viszonyítva. Azonban az OT szint a D1-ClB-60 ($8,21 \pm 0,12$ pg/ml, $p < 0,001$), a D2-ClB-60 ($7,64 \pm 0,51$ pg/ml, $p=0,006$) a D1-ClB-90 ($8,82 \pm 0,09$ pg/ml, $p < 0,001$) és a D2-ClB-90 csoportokban ($10,43 \pm 0,48$ pg/ml, $p < 0,001$), valamint a VP szint a D1-ClB-90 ($5,70 \pm 0,10$ pg/ml, $p=0,011$) és a D2-ClB-90 csoportban ($7,30 \pm 0,42$ pg/ml, $p < 0,001$) szignifikánsan megemelkedett.

A 7. ábrán a szérumban ACTH szint változásait tüntettük fel az abszolút kontrollok és a klórbenzol expozíciónak kitett állatok vonatkozásában ($F_{6,28}=28,470$, $P=1,804 \times 10^{-10}$).



7. ábra – Szérumban mért ACTH koncentrációk értékei

átlag $\pm$ SEM, n=10/kísérleti csoport, az értékek pg hormon/ml szérumban vannak megadva. Az ACTH-hoz tartozó (C: $p < 0,05$) szignifikancia értékeket ANOVA módszerrel, LSD post hoc teszttel jeleztük a kontrollok, valamint a 30, 60, és 90 napos, 0,1 μ g/tskg (D1), és 1 μ g/tskg (D2) dózisú kombinált klórbenzol expozíciós kezelési minták esetén. Az kontroll csoportokból mért bazális ACTH koncentrációt a 3-as jelzésű vonallal is jeleztük.

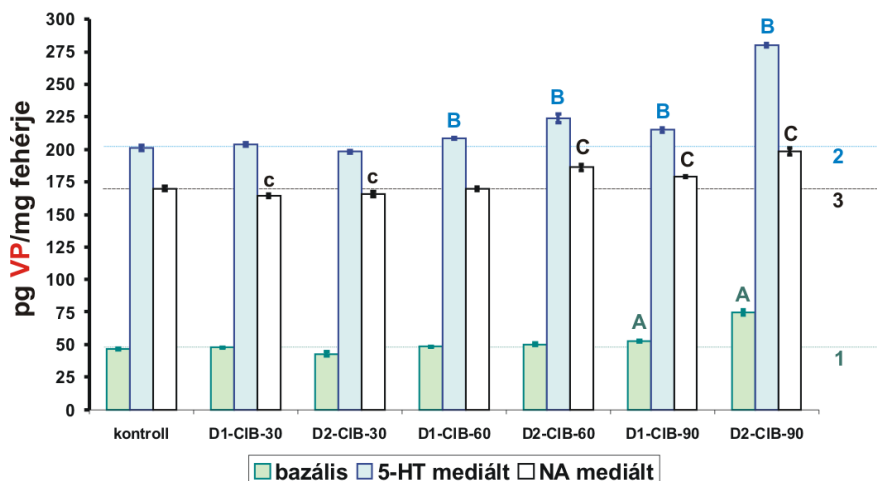
A kontroll csoport ACTH szintje ($83,85 \pm 1,68$ pg/ml) és a D1-CIB-30 csoport ($84,98 \pm 2,96$ pg/ml, $p = 0,894$), valamint a D1-CIB-60 ($95,77 \pm 2,16$ pg/ml, $p = 0,192$) ACTH szintje között nem volt szignifikáns különbség. A D2-CIB-30 ($119,00 \pm 3,87$ pg/ml, $p < 0,001$), a D2-CIB-60 ($150,08 \pm 5,39$ pg/ml, $p < 0,001$), és a D1-CIB-90 ($104,48 \pm 2,20$ pg/ml, $p = 0,021$) és a D2-CIB-90 ($165,00 \pm 13,21$ pg/ml, $p < 0,001$) csoportokban az ACTH szérum koncentráció szintje szignifikáns mértékben emelkedett az abszolút kontroll csoportéhoz képest.

4.4. Hipofízis sejt kultúrák hormon szekréciója

A sejt kultúrák standardizálási protokollja megfelelőnek bizonyult kísérleti protokollunk végrehajtásához, amelyeket az expozíciós kezelési adatok is mutatnak. Így azon eredményeket, melyek a kísérleti módszer alkalmasságát igazolják, külön nem tüntetjük fel.

A megfelelő kezelési protokollt követően a NH sejt kultúrák felülúszóit összegyűjtöttük és RIA módszerrel meghatároztuk a felszabadult VP és OT koncentrációkat. Az eredményeket a 8. és a 9. ábrán tüntettük fel.

4.4.1. A NH sejt kultúrák bazális és monoamin mediált vazopresszín (VP) szekréciója



8. ábra - NH monolayer sejt kultúrák bazális és monoamin mediált vazopresszin szekréció

átlag $\pm$ SEM, $n=5 \times 10$ sejt kultúra/kísérleti csoport, a sejt kultúrák VP szintjei pg hormon/mg fehérjében vannak megadva. Bazális (nem /monoamin/ mediált) szekréció (zöld oszlop). **5-HT mediált**: 1 órás 10^{-6} M 5-HT-nal való inkubációt követő szekréció (kék oszlop). **NA mediált**: 1 órás 10^{-6} M NA-nal való inkubációt követő elválasztás (fehér oszlop). A szignifikancia értékek: **A**: $p < 0,05$; a bazálisra, **B**: $p < 0,01$; a 5-HT mediáltra, **C**: $p < 0,001$, **c**: $p < 0,05$; a NA mediáltra számolt, a saját kontrolljaihoz képest. A kontroll állatokban megfigyelt, monoamin hozzáadása nélküli bazális szekréciót zöld, 1-es jelzésű vonallal; a 5-HT hozzáadást követő szekréciót kék, 2-es jelzésű vonallal, a NA hozzáadást követő szekréciót fekete, 3-as jelzésű vonallal jelöltük.

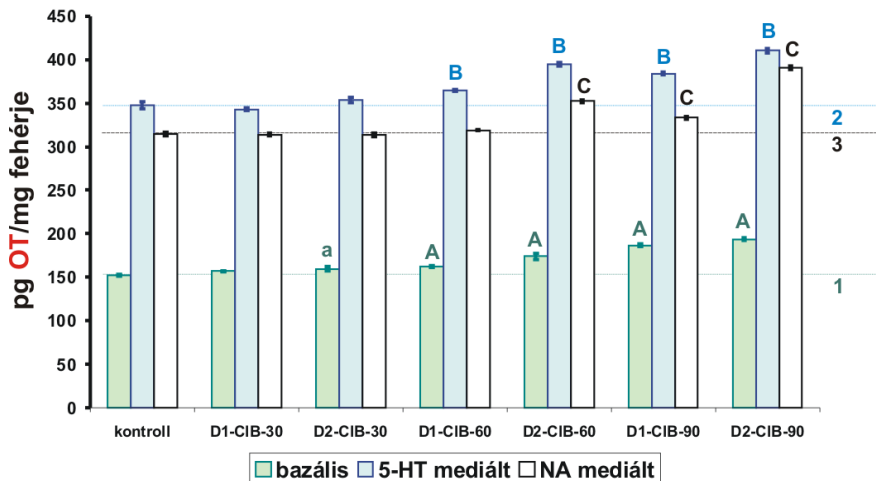
A NH sejt kultúrák bazális VP ($46,29 \pm 0,71$ pg/mg fehérje) szekrécióját a klórbenzol expozíciók módosították. Az expozícióknak megfelelően a következő eltéréseket találtuk: a VP felszabadulást a D1-CIB-30 ($47,6 \pm 0,29$ pg/mg fehérje, $p=0,541$), a D2-CIB-30 ($42,74 \pm 1,48$ pg/mg fehérje, $p=0,101$), a D1-CIB-60 ($48,42 \pm 0,25$ pg/mg fehérje, $p=0,321$) és a D2-CIB-60 ($50,21 \pm 1,12$ pg/mg fehérje, $p=0,07$) csoportokban a klórbenzol kezelés csak kis mértékben módosította, míg a D1-CIB-90 ($52,40 \pm 0,67$ pg/mg fehérje, $p=0,006$) és a D2-CIB-90 ($74,92 \pm 1,93$ pg/mg fehérje, $p < 0,001$) csoportokban szignifikáns mértékben megnövelte.

A 5-HT mediált VP szekréciók esetén a következő szignifikáns eltéréseket tapasztaltuk ($F_{13,56}=3513,035$ $P=1,665 \times 10^{-76}$): A kontroll NH sejt kultúrák bazális VP elválasztását a 10^{-6} M dózisú 5-HT kezelés szignifikánsan növelte ($201,08 \pm 2,20$ pg/mg protein, $p < 0,001$). Jelentős eltéréseket figyeltünk meg a kontroll és a kombinált klórbenzol expozíciónak kitett állatokból nyert NH kultúrák 5-HT mediált VP elválasztása között. A 5-HT mediált VP felszabadulás a 30 napos expozíciónak kitett állatokból nyert (D1-CIB-30: $203,84 \pm 1,06$ pg/mg fehérje, $p=0,199$; D2-CIB-30: $198,38 \pm 1,01$ pg/mg fehérje, $p=0,209$) csoportokban a kontrollokban mért értékekhez képest nem tért el szignifikánsan, azonban a 60 napos (D1-CIB-60: $208,68 \pm 0,63$ pg/mg fehérje, $p=0,001$; D2-CIB-60: $223,94 \pm 3,36$ pg/mg fehérje,

$p<0,001$) és a 90 napos (D1-ClB-90: $214,84\pm1,61$ pg/mg fehérje, $p<0,001$; D2-ClB-90: $279,96\pm1,36$ pg/mg fehérje, $p<0,001$) kombinált klórbenzol expozíciók szignifikánsan fokozták a VP elválasztását.

A NA mediált NH kultúrák VP felszabadulás esetén a következő statisztikai eltéréseket tapasztaltuk ($F_{13,56}=2044,148$ $P=6,216\times10^{-70}$): a kontroll NH sejt kultúrák bazális VP elválasztását 10^{-6} M dózisú NA kezelés szignifikánsan növelte ($169,78\pm1,69$ pg/mg protein, $p<0,001$). Karakterisztikus eltéréseket figyeltünk meg a kezeletlen patkányokból előállított NH sejtenyészetek NA mediált VP szekréciója és a kombinált klórbenzol expozíciónak kitett állatokból nyert mintáknál. A NA mediált VP szekréció a 30 napos expozíciónak kitett (D1-ClB-30: $164,36\pm1,16$ pg/mg fehérje, $p=0,011$; D2-ClB-30: $165,50\pm2,13$ pg/mg fehérje, $p=0,042$) csoportokban szignifikánsan csökkent a kontrollhoz viszonyítva, a D1-ClB-60 ($169,70\pm1,10$ pg/mg fehérje, $p=0,969$) csoportban közel azonos volt a kontrollokéval, a D2-ClB-60 ($186,10\pm2,29$ pg/mg fehérje, $p<0,001$) és a D1-ClB-90 ($178,88\pm0,59$ pg/mg fehérje, $p<0,001$), valamint a D2-ClB-90 ($198,52\pm2,46$ pg/mg fehérje, $p<0,001$) csoportban szignifikánsan megemelkedett.

4.4.2. A NH sejt kultúrák bazális és monoamin mediált oxytocin (OT) szekréciója



9. ábra - A NH sejt kultúrák bazális és monoamin mediált OTszekréció

átlag $\pm$ SEM, $n=5\times10$ sejt kultúra/kísérleti csoport, a sejt kultúrák OT szintjei pg hormon/mg fehérjében vannak megadva. **Bazális** (nem /monoamin/ mediált) szekréció (zöld oszlop). **5-HT mediált**: 1 órás 10^{-6} M 5-HT-nal való inkubációt követő elválasztás (kék oszlop). **NA mediált**: 1 órás 10^{-6} M NA-nal való inkubációt követő szekréció (fehér oszlop). A szignifikancia értékek: **A**: $p<0,05$ **a**: $p<0,005$: a bazálisra, **B**: $p<0,001$: a 5-HT mediáltra, **C**: $p<0,001$: a NA mediáltra számolt, a saját kontrolljaihoz képest. A kontroll állatokban megfigyelt, monoamin hozzáadása nélküli alap szekréciót zöld, 1-es jelzésű vonallal; a 5-HT hozzáadást követő elválasztást, kék, 2-es jelzésű vonallal; a NA hozzáadást követő szekréciót fekete, 3-as jelzésű vonallal jelöltük.

A NH monolayer sejtkultúrák bazális OT ($152,28 \pm 1,10$ pg/mg fehérje) elválasztásában a következő eltéréseket találtuk: az OT felszabadulást a D1-ClB-30 ($156,96 \pm 0,68$ pg/mg fehérje, $p=0,136$) csoportban a kezelés kis mértékben fokozta, és ez az emelkedés a D2-ClB-30 ($159,62 \pm 2,32$ pg/mg fehérje, $p=0,021$), a D1-ClB-60 ($162,12 \pm 1,13$ pg/mg fehérje, $p=0,002$), a D2-ClB-60 ($174,00 \pm 3,33$ pg/mg fehérje, $p<0,001$), a D1-ClB-90 ($186,76 \pm 1,39$ pg/mg fehérje, $p<0,001$) és a D2-ClB-90 ($193,76 \pm 1,30$ pg/mg fehérje, $p<0,001$) csoportokban már statisztikailag szignifikáns volt.

A 5-HT mediált hormon felszabadulások esetén a következő statisztikai eltéréseket tapasztaltuk ($F_{13,56}=2378,677$ $P=9,01 \times 10^{-72}$): a kontroll sejtkultúrák bazális OT elválasztását a 10^{-6} M dózisú 5-HT kezelés szignifikánsan növelte ($347,91 \pm 3,91$ pg/mg protein, $p<0,001$). Eltéréseket figyeltünk meg a kontrollokból és a kombinált klórbenzol expozíciónak kitett patkányokból készült NH kultúrák 5-HT mediált OT szekrécijában. A 5-HT mediált OT elválasztás a 30 napos expozíciónak kitett (D1-ClB-30: $342,98 \pm 1,56$ pg/mg fehérje, $p=0,117$; D2-ClB-30: $353,68 \pm 3,18$ pg/mg fehérje, $p=0,068$) csoportokban a kontrollban mért értékekhez képest nem tért el szignifikánsan. A 60 napos (D1-ClB-60: $365,12 \pm 1,20$ pg/mg fehérje, $p<0,001$; D2-ClB-60: $394,78 \pm 1,98$ pg/mg fehérje, $p<0,001$) és a 90 napos (D1-ClB-90: $384,40 \pm 1,88$ pg/mg fehérje, $p<0,001$; D2-ClB-90: $410,70 \pm 2,67$ pg/mg fehérje, $p<0,001$) kombinált klórbenzol expozíciók szignifikánsan emelték az OT elválasztást,

A NA mediált hormon felszabadulás esetén a következő statisztikai eltéréseket tapasztaltuk ($F_{13,56}=2706,406$ $P=2,445 \times 10^{-73}$): a kontroll NH sejtkultúrák bazális OT szekréciját a 10^{-6} M dózisú NA kezelés szignifikánsan megnövelte ($314,86 \pm 1,92$ pg/mg protein, $p<0,001$). Eltéréseket figyeltünk meg a kontroll és a kombinált klórbenzol expozíciónak kitett patkányokból nyert NH kultúrák NA mediált OT elválasztásában. A NA mediált OT felszabadulás a 30 napos expozíciónak kitett (D1-ClB-30: $314,22 \pm 1,42$ pg/mg fehérje, $p=0,794$; D2-ClB-30: $314,06 \pm 2,02$ pg/mg fehérje, $p=0,794$) csoportokban, valamint a D1-ClB-60 ($319,16 \pm 0,77$ pg/mg fehérje, $p=0,083$) csoportban közel azonos volt a kontrolléval. A D2-ClB-60 ($352,66 \pm 1,58$ pg/mg fehérje, $p<0,001$) és a D1-ClB-90 ($333,62 \pm 1,66$ pg/mg fehérje, $p<0,001$), valamint a D2-ClB-90 ($390,88 \pm 1,86$ pg/mg fehérje, $p<0,001$) csoportban viszont szignifikánsan megemelkedett.

4.4.3. A kombinált klórbenzol kezelt patkányok adenohipofízis (AdH) sejt kultúráinak ACTH elválasztása

Az *in vivo* CIB kezeléseknek (0, 30, 60 és 90 nap) kitett állatok AdH tenyészetének ACTH hormon elválasztása mutatja, hogy a CIB hatására dózis és kezelési időtartamtól függően emelkedett az elválasztott ACTH mennyisége *in vitro*. Szignifikáns eltéréseket 90 napos CIB kezelés mellett mindkét alkalmazott dózis esetében megfigyelhettük.

CIB kezelési sémák		CIB kezelési dózisok hatására felszabadult ACTH/ mg prot	
	n	D1-CIB	D2-CIB
Kontroll (0 nap)	24	141 ±7	141 ±7
+ 30 mM K ⁺	24	211± 12 ^B	211± 12 ^B
AVP (10 ⁻⁶ M)	24	237±18 ^B	237±18 ^B
CIB 30 nap	24	146±7	149±7
CIB 60 nap	20	157±8	165±8 ^A
CIB 90 nap	20	163±7 ^A	189±9 ^A

2. Táblázat - A klórbenzol expozíciók hatása az ACTH elválasztásra *in vitro* AdH tenyészeteknél

Átlag±SEM, n=24/kísérleti csoport, az eredmények pg hormon/mg protein értékekben adtuk meg. A szignifikancia értékek ANOVA módszerrel, LSD post hoc teszttel kerültek kiértékelésre. A kontroll csoport, valamint a 0, 30, 60, és 90 napos, 0,1 µg/tskg (D1) és 1 µg/tskg (D2) dózisú kombinált CIB expozíciónak kitett állatokból származó AdH tenyészetek, és az aspecifikus (+ 30 mM K⁺) és specifikus (AVP 10⁻⁶M) ingerhatásokra adott kontakt ACTH válaszok között. Szignifikancia értékek: **A**: $p < 0,05$ **a**: $p < 0,005$: a bazálisra, **B**: $p < 0,001$: a bazálisra vonatkoztatva.

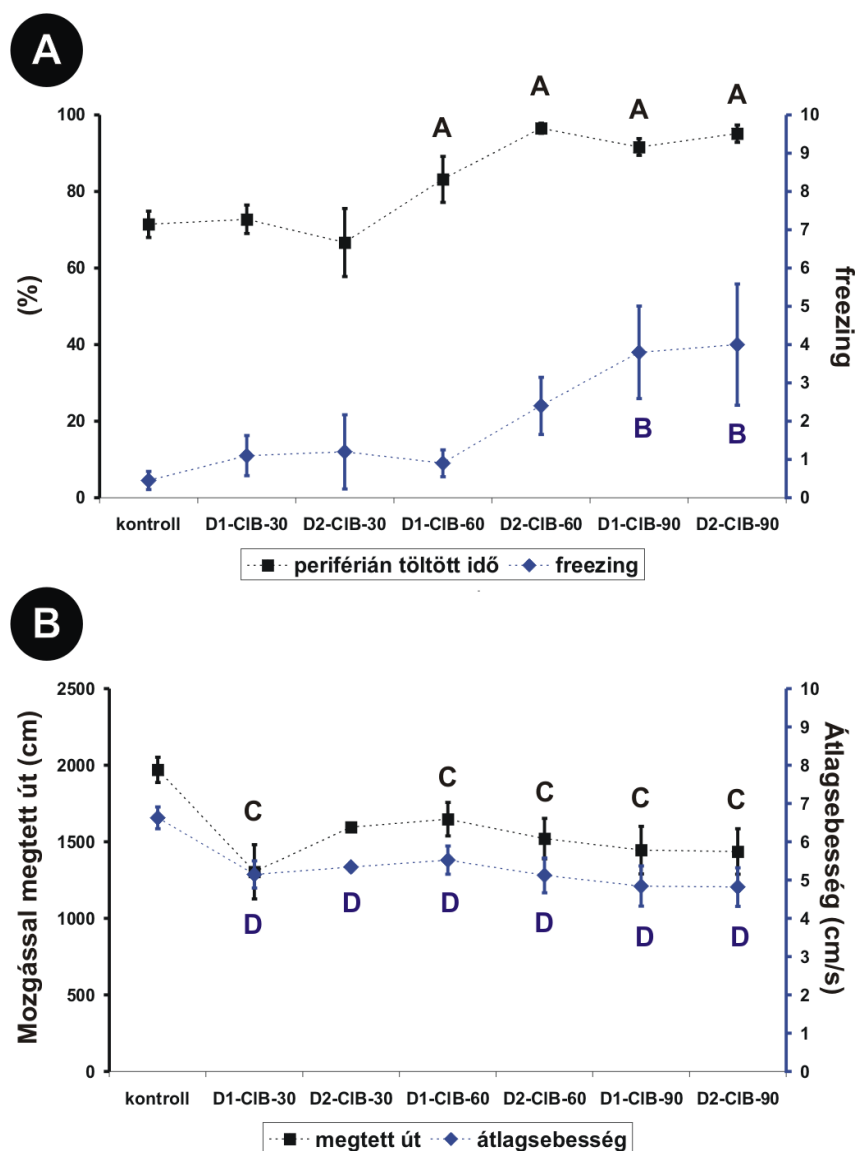
4.5. A kombinált klórbenzol expozíciók hatása a szorongásos viselkedésmintázatokra

A klórbenzolok viselkedéselemekre (szorongás, lokomotoros aktivitás és exploratív viselkedés) gyakorolt hatásait OF és EPM tesztekkel vizsgáltuk.

4.5.1. Viselkedéselemek az OF tesztekben

A szorongásra utaló, százalékban kifejezett, periférián töltött időt ($F_{6,58}=5,939$ $P<0,001$) és a freezingek számát ($F_{6,58}=4,144$ $P=0,002$) a **10/A.** ábra mutatja. A 30 napos kombinált klórbenzol expozíció sem a D1 ($72,72\pm 3,71$ %, $p=0,81$) sem a D2 ($66,68\pm 8,87$ %, $p=0,49$) dózis esetén nem módosította szignifikáns mértékben a periférián töltött időt. A D1-ClB-60 ($83,17\pm 6,01$ %, $p=0,03$), a D2-ClB-60 ($96,52\pm 1,29$ %, $p<0,01$), a D1-ClB-90 ($91,61\pm 2,20$ %, $p<0,01$) és a D2-ClB-90 ($95,13\pm 2,25$ %, $p<0,01$) csoportokban azonban a perifériás tartózkodás ideje statisztikailag kimutatható mértékben fokozódott a kontroll csoporthoz viszonyítva ($71,43\pm 3,44$ %). A kombinált klórbenzol expozíció megváltoztatta a freezingek számát is. A 30 és a 60 napos kombinált ClB expozíciónak egyik dózis esetén sem volt szignifikáns a hatása (D1-ClB-30: $1,10\pm 0,52$, $p=0,43$; D2-ClB-30: $1,20\pm 0,96$, $p=0,48$; D1-ClB-60: $0,90\pm 0,34$, $p=0,59$; D2-ClB-60: $2,40\pm 0,74$, $p=0,07$). A 90 napos kombinált ClB expozíciós időtartam esetén azonban, a freezingek számának emelkedése a D1 ($3,80\pm 1,2$, $p<0,01$) és a D2 ($4,00\pm 1,58$, $p<0,01$) csoportban szignifikánsnak bizonyult a kontroll csoporttal összevetve ($0,45\pm 0,23$).

A spontán lokomotoros aktivitást jelző megtett utat ($F_{6,58}=4,043$ $P=0,02$) és az átlagsebességet ($F_{6,58}=3,68$ $P=0,04$) az Ethovision rendszerrel rögzítettük és a **10/B.** ábrán jelöltük. A kontroll csoporthoz ($1969,62\pm 82,96$ cm; $6,62\pm 0,28$ cm/sec) viszonyítva, a D1-ClB-30 ($1303,64$ cm, $p<0,001$; $5,14\pm 0,35$ cm/sec, $p<0,01$), D2-ClB-30 ($1595,25\pm 25,92$ cm, $p=0,06$; $5,34\pm 0,08$ cm/sec, $p=0,04$), D1-ClB-60 ($1647,90\pm 109,34$ cm, $p=0,04$; $5,52\pm 0,36$ cm/sec, $p=0,02$), D2-ClB-60 ($1520,41\pm 131,51$ cm, $p=0,03$; $5,12\pm 0,45$ cm/sec, $p=0,01$), D1-ClB-90 ($1445,34\pm 155,64$ cm, $p<0,001$; $4,84\pm 0,52$ cm/sec, $p<0,01$) és a D2-ClB-90 ($1436,56\pm 149,18$ cm, $p<0,01$; $4,81\pm 0,50$ cm/sec, $p<0,01$) csoport esetében is egyaránt csökkent mindkét detektált paraméter értéke. A csökkenés mértéke a D2-ClB-30 csoportot kivéve (a megtett útra vonatkozóan) minden esetben szignifikáns volt.

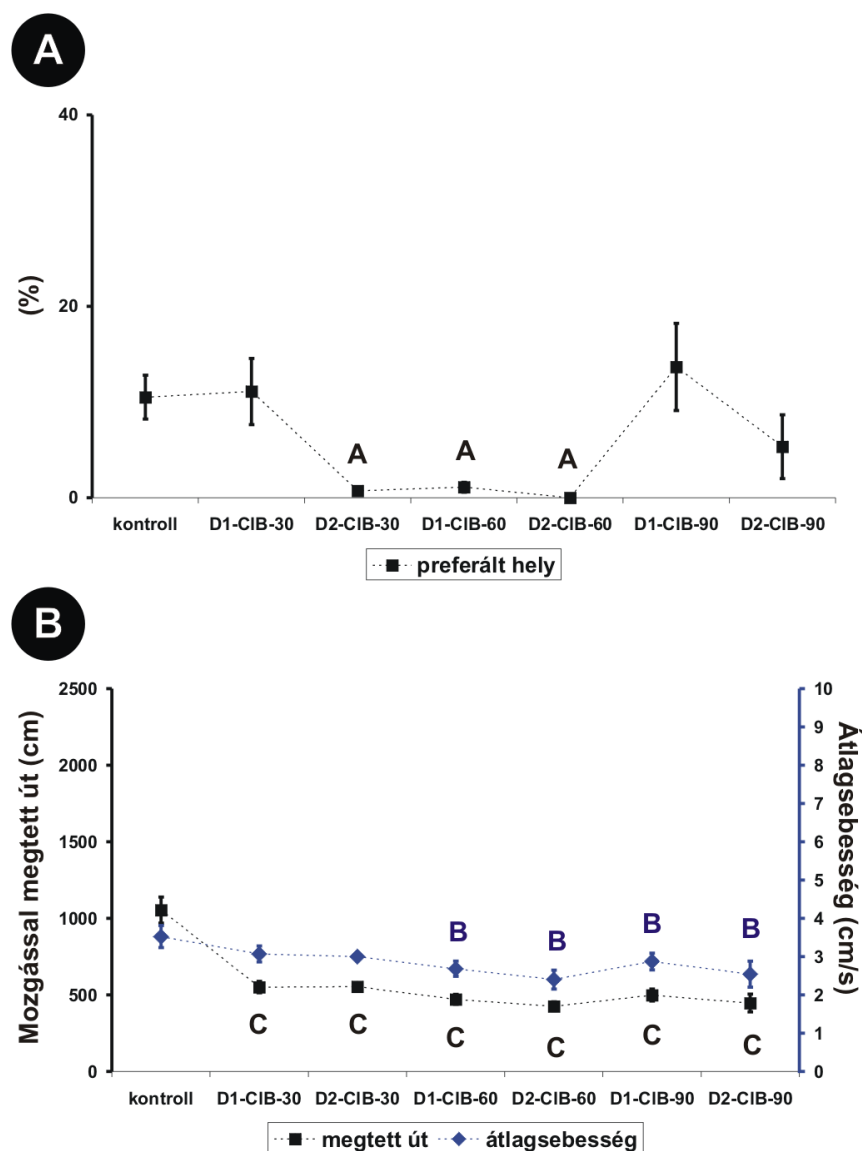


10. ábra - Szorongás és exploratív viselkedés az open field tesztekben krónikus, kombinált CIB expozíciók hatására

átlag $\pm$ SEM, n=10/kontroll vagy n=10/expozíciónak kitett csoportok. A kontroll és az 0,1 μ g/tskg (D1) és 1 μ g/tskg (D2) dózisú expozíciónak kitett csoportok közötti szignifikáns eltéréseket **A**, **B**, **C** vagy **D** ($p < 0,05$) betűkkel jelöltük és ANOVA módszerrel, Fisher-féle LSD post hoc teszt segítségével elemeztük. Az ábra **A** része a szorongáshoz köthető viselkedési elemekre gyakorolt hatást mutatja, az ábra **B** része a lokomóciót érintő változásokat jelzi. **A** rész: periférián eltöltött idő a teljes vizsgálati idő %-ában megadva (fekete pontozott vonal/négyzet, a bal oldali y tengelyhez rendelve) és a freezing (kék pontozott vonal/rombusz, a jobb oldali, kék y tengelyhez rendelve). **B** rész: a mozgással megtett út (fekete pontozott vonal/négyzet, a bal oldali y tengelyhez rendelve) és az átlagsebesség (kék pontozott vonal/rombusz, a jobb oldali, kék y tengelyhez rendelve).

4.5.2. A kombinált klórbenzol kezelés hatása a viselkedés EPM tesztekkel detektálható elemeire

A szorongáshoz közvetlenül kapcsolható (11/B. ábra) és arra közvetve utaló lokomotoros (11/B. ábra) viselkedéselemeket vizsgáltuk EPM tesztekben.



11. ábra - Szorongás és exploratív viselkedés az elevated plus maze testben krónikus, kombinált CIB kezelések hatására

átlag $\pm$ SEM, n=10/kontroll vagy n=10/expozíciónak kitett csoportok. A kontroll és az 0,1 μ g/tskg (D1) vagy 1 μ g/tskg (D2) dózisú expozíciónak kitett csoportok közötti szignifikáns eltéréseket **A**, **B**, **C** ($p < 0,05$) betűkkel jelöltük és ANOVA módszerrel, Fisher-féle LSD post hoc teszt segítségével elemeztük. Az **A** rész a szorongáshoz köthető viselkedési elemekre gyakorolt hatást mutatja, a **B** rész a lokomóciót jelzi. **A** rész: a nyitott karokban eltöltött idő a teljes vizsgálati idő %-ában megadva (fekete pontozott vonal/négyzet). **B** rész: a megtett út (fekete pontozott vonal/négyzet, a bal oldali y tengelyhez rendelve) és az átlagsebesség (kék pontozott vonal/rombusz, a jobb oldali, kék y tengelyhez rendelve)

A preferált hely (%-ban kifejezett; a nyitott karokban és a teljes, arénában töltött idő aránya) vizsgálatakor különbségek voltak megfigyelhetők ($F_{6,58}=3,035$ $P=0,012$) a csoportok között. A megnövekedett szorongás jeleként a vizsgált paraméter értéke szignifikánsan csökkent a D2-ClB-30 ($0,71\pm0,19$ $p=0,04$) a D1-ClB-60 ($1,10\pm0,51$ $p=0,01$) és a D2-ClB-60 ($0,00\pm0,00$ $p=0,03$) csoportok esetén. A D1-ClB-30 ($11,10\pm3,46$ $p=0,87$), a D1-ClB-90 ($13,66\pm4,55$ $p=0,39$) és a D2-ClB-90 ($5,32\pm3,33$ $p=0,27$) csoportban mért változások azonban nem voltak szignifikánsak a kontroll ($10,51\pm2,30$) csoporthoz viszonyítva.

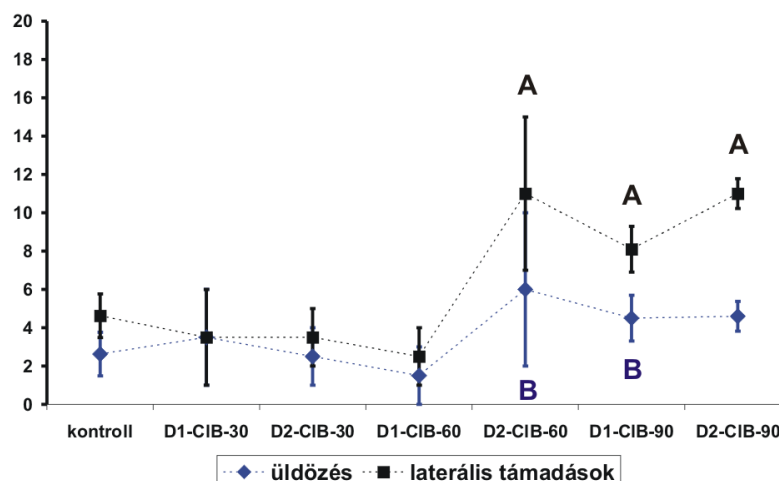
Detektálásra került a mozgással megtett út ($F_{6,58}=13,075$ $P<0,001$) és az átlagsebesség is ($F_{6,58}=1,991$ $P=0,082$). A megtett út szignifikánsan csökkent a 30 (D1-ClB-30: $550,75\pm36,93$ cm, $p<0,001$; D2-ClB-30: $552,97\pm7,26$, $p<0,001$), a 60 (D1-ClB-60: $471,30\pm32,58$ cm, $p<0,001$; D2-ClB-60: $425,86\pm28,95$, $p<0,001$) és a 90 (D1-ClB-90: $498,83\pm39,35$ cm, $p<0,001$; D2-ClB-90: $446,49\pm58,26$, $p<0,001$) napos kombinált ClB expozíciós csoportokban a kontroll ($1053,84\pm85,90$ cm) csoporttal összehasonlítva. Az átlagsebesség csökkenése a D1-ClB-30 ($3,07\pm0,20$ cm/s, $p=0,19$) és a D2-ClB-30 ($3,00\pm0,00$ cm/s, $p=0,24$) csoportokban nem, de a D1-ClB-60 ($2,68\pm0,19$ cm/s, $p=0,01$), D2-ClB-60 ($2,40\pm0,24$ cm/s, $p=0,01$), D1-ClB-90 ($2,87\pm0,21$ cm/s, $p=0,048$) és D2-ClB-90 ($2,54\pm0,34$ cm/s, $p=0,03$) csoportokban azonban már szignifikánsnak bizonyult a kontroll ($3,52\pm0,28$ cm/s) csoporttal összevetve.

4.6. A kombinált krónikus klórbenzol expozíciók hatása az agresszív viselkedési elemekre

A kombinált ClB agresszióra gyakorolt hatásait módosított RI tesztekben vizsgáltuk.

4.6.1. Krónikus kombinált ClB kezelések hatása a viselkedéselemekre a RI tesztekben

A 12. ábrán az RI tesztben vizsgált viselkedési elemek (offenzív, defenzív és szociális viselkedés, exploratív stb.) közül az „intermale” agresszióban jellemző offenzív viselkedési formák körébe tartozó üldözést és laterális irányú támadásokat mutatjuk be.



12. ábra - Offenzív viselkedéselemek a resident-intruder tesztekben krónikus kombinált CIB expozíciók hatására

átlag $\pm$ SEM, n=10/kontroll vagy n=10/CIB-expozíciónak kitett csoportok. A kontroll és az 0,1 μ g/tskg (D1) és 1 μ g/tskg (D2) dózisú expozíciónak kitett csoportok közötti szignifikáns eltéréseket **A**, **B** ($p < 0,05$) betűkkel jelöltük. Laterális támadások száma (fekete pontozott vonal/négyzet) és üldözések száma (kék pontozott vonal/rombusz).

Az üldözés vizsgálatokor eltéréseket észleltünk a kombinált CIB kezelésnek kitett állatokban ($F_{6,24}=1,928$ $P=0,118$). Az értékek a D1-CIB-30 ($3,50 \pm 1,50$, $p=0,571$), D2-CIB-30 ($2,50 \pm 0,50$, $p=0,935$), és a D1-CIB-60 ($1,50 \pm 1,50$, $p=0,467$) csoportokban nem növekedtek meg jelentősen. Viszont a D2-CIB-90 ($4,60 \pm 0,87$, $p=0,085$) csoportban jelentősebb emelkedés volt megfigyelhető a kontroll ($2,62 \pm 0,65$) csoporthoz képest, de ez nem érte el a statisztikailag szignifikáns értéket. A D2-CIB-60 ($6,00 \pm 2,00$, $p=0,036$), és a D1-CIB-90 ($4,50 \pm 0,60$, $p=0,049$) csoportokban az üldözések száma szignifikánsan megemelkedett a kontroll állatok hasonló értékeihez viszonyítva.

A laterális irányú támadásokat is rögzítettük ($F_{6,24}=3,882$ $P=0,008$) és a következő eredményeket kaptuk. A 30 napos kombinált CIB expozíciónak kitett csoportokban sem a D1 ($3,50 \pm 2,50$, $p=0,673$), sem a D2 ($3,50 \pm 1,50$, $p=0,673$) dózis esetén nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést a kontroll ($4,62 \pm 1,13$) csoport eredményeihez viszonyítva. A 60 napos kombinált CIB expozíciók esetén a D1 ($2,50 \pm 1,50$, $p=0,428$) dózis nem emelte meg szignifikánsan a támadások számát. Ellenben, a D2-CIB-60 ($11,00 \pm 4,00$, $p=0,023$), a D1-CIB-90 ($8,10 \pm 1,19$, $p=0,038$) és a D2-CIB-90 ($11,00 \pm 0,77$, $p=0,003$) csoportokban a laterális irányú támadások száma a kontrollhoz mérten szignifikánsan fokozódott.

5. Megbeszélés, következtetések

A dolgozatban az EDC hatású vegyületek közül a halogénezett aromás szénhidrogének csoportjából a klórbenzolokat, mint modellvegyületeket kívántuk vizsgálni. A klórbenzolok – elsősorban a HCB – a mezőgazdaságban és az iparban széles körben alkalmazott [35, 38], EDC tulajdonságokkal [175] is rendelkező POP vegyületek. A klórbenzolok gyártását/használatát ugyan már számos országban betiltották, de a bioszférában [35] deponálódott jelentős mennyiség miatt e vegyületcsoport alkalmas a kutatási modellvizsgálatokra. Megfelelő rendszerben történő hatásvizsgálatukból származó eredmények extrapolálhatók más hasonló (perzisztens, lipofil, akkumulálódó) vegyületekre [25].

A hexaklórbenzol (HCB) a klórbenzolok legstabilabb, akkumulációra hajlamos, lipofil képviselője. Az alacsonyabb klórszubsztituált származékai is a POP vegyületek közé tartoznak. Az alacsony klórszubsztituált származékok biokémiai reaktivitása is igazolt [24].

Az élő organizmusokat egyszerre több környezeti expozíciós hatás éri. Irodalmi adatokból ismert kísérletek általában egy-egy környezetszennyező anyag hatására kialakult válaszmechanizmusok tanulmányozására irányulnak [28]. Munkánk fontos célja volt, hogy kombinált kémiai expozíciókat vizsgáljunk, továbbá e vizsgálatra alkalmas kutatási protokollt állítsunk be. Ennek érdekében a választott EDC hatású hexaklórbenzol és 1,2,4-triklórbenzol 1:1 arányú keverékét (ClB) használtuk expozitorként. Fontos kritérium volt az expozitor kiválasztásánál, hogy az, a környezetben előforduló EDC hatású vegyületekkel kapcsolatos tulajdonságokat reprezentálja. A klórbenzolok erre alkalmasnak mutatkoztak [176, 27] (3.3. fejezet).

A táplálékkal, ivóvízzel bevitt klórbenzolok jelentik a (humán) populációk egyik legfőbb biológiai (egészségügyi) kockázati tényezőjét. Kísérleteinkben ezért választottuk és standardizáltuk a tápcsatornán (gyomorszondán) keresztüli klórbenzolok expozícióit, mint kezelési sémát. Sikerült standardizálni az expozitor kezelési dózisát és a bevitel módját. Eredményeink az akkomodációval fenntartott környezeti-adaptív-potenciál kapacitásának változásaira és annak értékelésére alkalmas adatokat szolgáltatnak (3.3; 3.4 fejezet). A klórbenzolokkal folytatott kísérleteink megfelelően bizonyultak a kombinált és leggyakoribb expozíciót képviselő POP/EDC hatású környezeti terhelések modellezésére.

Irodalmi adatok alapján számos POP/EDC vegyület toxikus, azaz mg/testsúly kg-os, vagy nagyobb dózisai akut vagy krónikus expozíció esetén élettani – és sok esetben a viselkedést is befolyásoló – változásokat indukálhatnak. Kevésbé ismert az említettnél sokkal kisebb dózisu (µg/tskg), de krónikus expozíciójú klórbenzolok hatása. Az élő szervezetekbe táplálékkal,

ivóvízzel kerül be a krónikus, kis dózisú CIB terhelés. Egy diszkrét módon „gyorsított” kísérleti modell alkalmazása lehetővé teszi az EDC hatás kimutatását a deponálódott kémiai ágensekre vonatkozóan.

Kísérleti modellrendszerünkben igazoltan szubtoxikus dózisú, kombinált CIB expozíciókat használtunk (3.3 fejezet). Irodalomból ismert, hogy a klórbenzolok toxikus dózisaik módosítják a kísérleti állatok test és szervtömegét (máj és/vagy más szervek: pl. lép, vese, mellékvese) [177], továbbá egyes májfunkciót jelző szérumszulfotranszferáz enzim értékeket [178], valamint egyéb élettani funkciókat [179].

Munkánk során olyan kísérleti modellt kívántunk alkalmazni, amelyben teljesülnek a szubtoxikus expozítor használatának feltételei. Ennek érdekében megmértük az állatok test- és szervtömegét, valamint a szérumszulfotranszferáz enzimjeinek koncentrációit (SGOT, SGPT és GGT). Nem tapasztaltunk az állatokon vagy szerveiken strukturális károsodásra utaló jeleket. Korábbi és a jelenlegi eredményeink alapján megállapítottuk, hogy a 30, 60, 90 napig gasztrointesztinálisan bejuttatott, napi 0,1 vagy 1 µg/testsúlykg dózisú CIB expozíciók a vizsgált toxicitást jelző paramétereket a megengedett, normál tartományból nem mozdították ki, azokat szignifikánsan nem változtatták meg. Ezek tehát, szubtoxikus környezeti expozíciós hatásokként értelmezhetők (1. táblázat).

A CIB mint EDC modellvegyületek szubtoxikus dózisainak (0,1 és 1 µg/tskg/nap) a neuroendokrin rendszerekre irányuló hatásvizsgálatát egyrészt a leggyorsabb akkomodációs válasz, a viselkedési mintázatok követésével (szorongás, agresszió), valamint az azt meghatározó neuroendokrin celluláris mechanizmusokkal (stresszhormonok elválasztása) és neuroendokrin kommunikációval (biogén aminok aktivált hormonfelszabadulás) kívántuk követni. Celluláris események vizsgálatára *in vitro* modelleket (monolayer sejtkultúrákat) használtunk, amelyek sejtfunkcióit standardizáltuk (3.6.1; 3.7.1). Megállapítottuk a kísérleteinkbe bevont modell-tenyészeteknél, hogy a NH és AdH sejtek sem morfológiailag, sem sejtфизиológiailag nem mutatnak citotoxikus jellegeket a kezelések előtt és után.

Kutatási protokollunk kialakításakor a vonatkoztatási rendszerek standardizálásai is hangsúlyos szerepet kaptak. Így olyan, folyamatosan ellenőrzött kontrollrendszert vizsgáltunk, amelyben (3.3; és 3.4. fejezetek) az abszolút kontroll csoportok mellett, azonos számú stressz, negatív és pozitív kontrollokat is beállítottunk. Folyamatosan követtük a kontroll rendszereknél a kísérleti protokollban meghatározott vizsgálati paramétereket mind az *in vivo*, mind az *in vitro* vizsgálatokban. Statisztikai elemzések során kezelt kontrollrendszerek adatai a kialakított kontrollcsoportok között nem mutattak szignifikáns eltéréseket. Az adatok a kezelési protokoll alkalmasságát is megerősítették. Miután az

receptorok jelenléte és a VP, OT expresszióhoz és/vagy elválasztásához kapcsolt funkciók a hipotalamik rendszerben, valamint a neurohipofízisben eltérőek. A centrális, azaz a hipotalamik rendszerből funkcionálisan aktív neuroendokrin kommunikáció a periférián nem indukálódik. A neurohipofízis zavartalan hormonfelszabadulási funkciója közvetlen feltétele az említett kommunikációnak, és ezzel a neuroendokrin homeosztatikus szabályozásnak. A NH sejtkultúrákkal végzett *in vitro* vizsgálatok éppen ezen funkció egzakt feltételek melletti tanulmányozását teszik lehetővé.

A NH monolayer kontroll rendszerekből, és a CIB előkezelésekből készült standardizált sejtenyészeteket 10^{-6} M 5-HT-nal vagy NA-nal kezelve, a monoamin mediált VP, OT elválasztásra gyakorolt expozíciókat vizsgáltuk. A kontroll csoportokból készült neurohipofízis VP, OT elválasztás az 5-HT vagy a NA kezelést követően az irodalmi adatoknak megfelelően szignifikáns mértékben növekedett. A klórbenzol előkezelt állatokból származó neurohipofízis kultúrák esetén a szubtoxikus, de krónikus EDC kémiai expozíciót modellező környezeti hatás tovább fokozta a monoamin indukált VP és OT felszabadulást.

Eredményeink alapján feltételezhető, hogy *in vivo* körülmények között a vizsgált klórbenzol expozíciók hatásai már az alacsonyabb szabályozási, azaz a neurohipofízis hormonelválasztásának szintjén is megjelenhetnek.

A modellezett környezeti hatások szerepe a monoamin receptorok szenzitivitásának módosulásaival, vagy a transzmitter molekulák diszkrét megváltozásaival, vagy a kiváltott válaszok minőségi/mennyiségi változásaival értelmezhetők, következtetéseinket igazolják Bleavins és mtsai által végzett kísérletek [41] eredményei. Kísérleteinkben krónikus és magasabb dózisu klórbenzol expozíciót követően tapasztalunk abnormális agresszivitás és hiperexcitabilitás mellett, különböző központi idegrendszeri területeken, így a hipotalamuszban is fokozott monoamin (pl. 5-HT és NA) koncentrációkat.

Mivel a szérumban mért VP, OT és ACTH emelkedettnek mutatkozott a CIB kezelési időtartamok függvényében, és a kísérleti állatok viselkedéselemei is eltéréseket mutattak, vizsgálatainkat a pszichiátriai kórképek kialakulásában szerepet játszó neurotranszmitterek és magatartászavarok közötti összefüggés keresésével egészítettük ki.

Eredményadataink így részben korreláltak azokkal az irodalmi adatokkal, amelyeket szorongással vagy agresszióval járó pszichiátriai betegségekben szenvedő személyek esetén tapasztaltak. Irodalmi adatok szerint egyes pszichiátriai kórképekben betegeknél magasabb plazma és cerebrospinalis folyadék VP koncentrációt detektáltak [184]. Poszttraumás stressz zavarban [185] vagy obszesszív kompulzív zavarban [186] szenvedő betegeknél a szérumban VP szint megemelkedett, amelyhez az utóbbi csoportban a betegek liquor VP koncentrációjának növekedése is társult [184].

Szorongásos zavarokban a legtöbb tanulmány negatív összefüggést talált a szérumszorongás (OT) szint és a szorongásos (OF) tesztekben alkalmazott, a szorongás mértékét jelző pontszámok között [187]. Ez ellentétben áll a kísérleteinkben tapasztalt szérumszorongás szint és az anxiétást vizsgáló tesztek eredményei közötti összefüggéssel. A szérumban észlelt emelkedett OT szint a szorongás oldását váltja ki, ugyanakkor az OT-nal szimultán jelenlévő VP viszont szorongásfokozódást eredményez. A látszólagos ellentmondás oldása kapcsán feltételezhető, hogy e két releváns aktív stresszhormon szintjének aránya közvetítheti (határozhatja meg) a tényleges viselkedési mintázat expresszióját.

Lehetséges továbbá, hogy a kapott eredmények háttérében az érintett monoaminerg receptorok peptiderg neuronokon megjelenő eltérő mintázatai, vagy a klórbenzolok egyéb ismeretlen, az OT szekréciót stimuláló hatásai állhatnak.

Ismert, hogy a VP-erg monoaminerg rendszerek módosíthatják az ACTH felszabadulást, ezáltal a stresszre adott válaszreakciókat. A stressz aktiválni képes a hipocampális és hipotalamikus 5-HT-erg neuronokat, ez az 5-HT-erg hatás pedig a VP-erg rendszeren keresztül fokozza a CRH és közvetve az ACTH szekréciót a hipotalamusz, a hipofízis, a hipotalamo-hipofízeális portális keringés, vagy a mellékvese szintjén [50, 188]. A hipotalamusz-hipofízis-mellékvese tengely krónikusan alacsony, vagy akutan magas aktivitása egyaránt okozhat fokozott agresszív és szorongásos megnyilvánulásokat.

Emberekben összefüggést találtak a hipotalamusz-hipofízis-mellékvese tengely túlműködése és egyes pszichiátriai betegségekben (pl. hangulatzavarokban, váltakozó explozív zavarban) megfigyelhető agresszív események frekvenciája között [189].

Kísérleteinkben standardizált és alkalmazott klórbenzol expozíciókat követően OF és EPM (szorongási), valamint RI (agresszivitási) tesztekben vizsgáltuk az állatok emocionális viselkedését. Az anxiétást jelző paraméterek (a periférián töltött idő növekedése, a freezing számának emelkedése, a megtett út és az átlagsebesség csökkenése az OF tesztben; a nyitott karokban töltött idő arányának csökkenése a teljes arénában töltött időhöz viszonyítva, a megtett út és az átlagsebesség csökkenése az EPM tesztben) változásait detektáltuk, melyek mind a két krónikus CIB dózis esetében, de főként az expozíciós idő növekedésével váltak szignifikánssá. A RI tesztben az agresszivitás egyik paraméterének tekinthető üldözés és a laterális támadások számának fokozódása volt megfigyelhető a hosszabb expozíciós időtartamok és magasabb dózisok esetén. Az egyéb vizsgált viselkedéselemekben nem történt lényeges változás egyik viselkedési tesztben sem. Mindez igazolni látszik azt a korábbi feltevésünket, hogy az expresszáldott viselkedésmintázat megjelenésében az aktív, azaz a felszabadult OT és VP koncentrációk aránya jelentős szerepet játszik. A deponálódott CIB mennyiségek fokozódásának függvényében emelkedett, (de nem azonos arányban) az aktív

OT és VP mennyisége (*in vitro* és *in vivo*). Ugyanakkor a magatartás változásához köthető hatás szempontjából e két hormon aktuális aránya tűnik kiváltónak, ami a D1 és D2 dózisok 30, 60 és 90 napos kezelési protokollja során történt eseményekkel detektálhatóvá vált (10-12. ábra).

A diszkrét, krónikus ClB expozíciók modulálták az állatok emocionális viselkedését, így a kapott eredmények alapján megállapíthatjuk, hogy az alkalmazott expozíciók anxiogén és agressziót fokozó hatással is rendelkeznek.

Az eredmények alapján megállapításainkat és következtetéseinket a célkitűzés kérdésköreinek megfelelően csoportosítottuk.

A ClB vegyületek kémiai jellegük, fiziko-kémiai sajátosságai, ismert biológiai hatásai (EDC hatások), valamint társadalmi vonatkozásaik (kemizáció, társadalmi tevékenységek, xenobiális jelleg) miatt széles körben elterjedtek. Igazoltuk, hogy a hierarchikus komplexitási szinteket képviselő evolúció minden szintjén jelen vannak, így környezettudományi megközelítés szerint alkalmasak POP/EDC vegyületek expozíciós modelljeként való vizsgálatokra.

A ClB vegyületek expozítoroként történő alkalmazásakor kombinált kémiai expozíciókat kívántunk vizsgálni. A szakirodalom az expozíciós vizsgálatoknál leginkább csak egy hatásra bekövetkező válaszokat tanulmányoz, ez azonban nem életszerű, hiszen a földi környezetben működő rendszereket (élettelen, élő, társadalom) több expozíciós hatás éri. A legegyszerűbb kombinált expozíciós hatások vizsgálatához indokolt volt kutatás-módszertani vizsgálatok elvégzése, amelynek eredményeként a standardizált kombinált modell-expozítor és vizsgálati modellrendszer kialakítása történt. Teljesült az alkalmas expozíciós út szerinti kísérleti rendszer módszertani kutatásokkal standardizált beállítása.

A kombinált, extrém alacsony dózisú, krónikus, táplálkozási útvonalat szimuláló, előzetesen standardizált ClB kezelésekből származó eredményeink új információkkal szolgálnak [190, 191].

A, Wistar patkányok kezelésekor a gasztrikus szondán át adott extrém alacsony ClB szubtoxikus dózisok (0,1 és 1 µg/tskg/nap) megváltozott szérum OT, VP és ACTH koncentrációt eredményeztek, amely a módosult neuroendokrin szabályozást igazolta.

B, A neuroendokrin szabályozás vizsgálatára alkalmas monoamin (szerotonin, noradrenalin) rendszeren keresztül mediált OT, VP elválasztásban is jelentős változásokat detektáltunk, ami korábbi vizsgálatok alapján nem volt ismert.

C, Az említett stresszhormonok (VP, OT) aktív, szérumbeli koncentrációinak emelkedését az in vivo vizsgálatok mellett alkalmazott in vitro kutatások is megerősítették.

D, A szerotonin és noradrenalin közvetítette VP és OT elválasztás CIB hatására kialakult fokozódása korrelált a modellvizsgálatokba vont kísérleti állatok viselkedés mintázatainak változásaival, fokozódott a szorongás és agresszió a kezelési dózisok és időtartamok függvényében.

E, A neuroendokrin homeosztatikus szabályozási rendszerben mért eltérések a viselkedés szintjén is detektálhatóvá váltak. A mechanizmus szintű eredményprezentálás során felvetettük annak lehetőségét, hogy az OT és VP aktív hormonformáinak arányával szólhat bele a magatartásformák szabályozásába. Vizsgálati protokollunk ezen feltevés igazolására alkalmas adatokkal szolgált.

F, A környezetben jelen lévő, EDC hatású vegyületek tulajdonságai a CIB-kal összevethetők. Eredményeink alapján ezek jelentős kémiai, biológiai kockázati tényezőként kezelhetők.

- Kémiai kockázatuk xenobiális jellegükből származtatható, amit perzisztenciájuk, reaktív tulajdonságaik, lipofilitásuk, stb. képvisel.
- Biológiai kockázatuk kémiai jellegükből adódóan, továbbá a dózisfüggő hatásokon túl, a homeosztatikus szabályozási rendszerek módosításával hozható összefüggésbe. Ennek eredménye a magatartás, az azonnali alkalmazkodási mintázat megváltozása. Mindezek humán vonatkozásban akár pszichiátriai kórfolyamatok kialakulásának kockázatát fokozhatják.

Kutatási eredményeink szerint a kémiai környezeti terhelésekben, széles körben jelen lévő, modellezett POP/EDC vegyületek, mint expozítorok az élő rendszerek homeosztázisában változásokat generálnak extrém alacsony dózis és krónikus kezelések esetén is. Ennek következményeként a biológiai rendszerek homeosztatikus alkalmazkodási potenciálja módosul, amelyek azonnali alkalmazkodási mintázataikban, a viselkedésben detektálható (a kognitív folyamatokat és a szociális viselkedési formákat is befolyásoló) eltéréseket indukál.

Eredményeink alátámasztják, hogy mielőbb újra kell gondolni és tovább kell finomítani / szigorítani a vizsgált POP/EDC vegyületek alkalmazásával kapcsolatos szabályozást. A jövőbeni törvényi szabályozás nem hagyhatja figyelmen kívül azokat a kutatási eredményeket, amelyek egyre nagyobb számban igazolják az EDC vegyületek szubtoxikus dózis esetén is kimutatható, időben elhúzódó veszélyeit.

7. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani professzoraimnak, munkahelyi vezetőimnek, akik egész pályám alatt támogatták tudományos munkámat.

Megkülönböztetett hálával és köszönettel tartozom Dr Gálfi Mártának, habilitált főiskolai tanárnak, aki ráirányította figyelmemet a környezeti hatások fontos szerepére a betegségek kialakulásában, bevezetett a kutatómunka rejtelmeibe és segítséget nyújtott a disszertáció elkészítésében. Az ő vezetésével és baráti támogatásával készültek az elmúlt évtizedek alatt közös előadásaink és publikációink.

Köszönetemet fejezem ki az I sz. Belgyógyászati Klinika minden munkatársának, akik munkám során segítségemre voltak. Főnökeimnek, Dr László Ferenc egyetemi tanárnak, aki mellett indult pszichoneuroendokrinológiai érdeklődésem, Dr Julesz János egyetemi tanárnak, aki az írás rejtelmeibe avatott be, Dr Szarvas Ferenc egyetemi tanárnak, akivel a mai napig a szegedi endokrinológia történetén dolgozunk. Elhunyt kollégámnak Dr Gáspár László egyetemi docensnek, akivel számos sikeres kongresszuson szerepeltünk együtt.

Külön köszönöm Dr Radács Mariannak és Dr Juhász Annának önzetlen segítségét és együttműködését a tudományos munkám során.

Köszönettel tartozom a megjelent munkákban szereplő összes szerzőtársamnak, elsősorban Dr Rác Károly egyetemi tanárnak, aki már évek óta bíztatott, hogy itt az ideje a disszertáció megírásának.

Külön jár köszönet barátnőmnek Kóthy Juditnak, aki már évek óta csiszolgatja magyar nyelvű stílusomat és szigorú nyelvhelyességi bírálattal látja el és javíttatja írásaimat.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm szüleimnek, gyermekeimnek és a társamnak a türelmet, kitartást és támogatást, amely nélkül ez a munka soha nem készülhetett volna el.

8. Felhasznált irodalom

- [1] A. A. Berezin: *UHD effect and isotopic self-organization*. pp.:217-298. in: P.C. Ender and J. Schulte: *Ultra High Dilution. Physiology and Physics*, Kulwer Academic Publischer (1994).
- [2] C. W. Smith: *Coherence in living biological systems*. *Neuronal Network World*. 3:379-388. (1994).
- [3] G. Lednyiczky: *In vitro und in vivo versuche, um die kontrollfunktion niederenergetischer bioinformationen und anderer schwingungen zu demonstrieren*. *Facultas Wien IX*: 115-152 (1997).
- [4] E. A. Craig: *The heat shock response*. *Crit. Rev. Biochem.* 18: 239-280 (1985).
- [5] J. T. Edsall, A. H. McKenzie: *Water and proteins. II. The location and dynamics of water in protein system and its relation to thier stability and properties*. *Adv. Biophys.* 16:53-183 (1983).
- [6] S. Hanash: *Disease Proteomics*. *Nature* 422: 226-232 (2003).
- [7] E. Huag, et al.: *Gene expression phenotypic models that predict the activity of oncogenic pathways*. *Nature genetics*. 34:226-230 (2003).
- [8] H. Briethaupt: *Biological rhythms and biocommunication*. pp: 122-176. in: F. A. Popp et al.: *Electromagnetic Bioinformatin*. Urban & Schwarzenber, 2. Auflage, München-Wiwn-Baltimore (1989).
- [9] L. Hood, D. Galas: *The digital code of DNA*. *Nature* 421: 444.448 (2003).
- [10] Patocs, A. Klein, I. Szilvasi, A. Gergics, P. Toth, M. Valkusz, Z. Forizs, E. Igaz, P. Al-Farhat, Y. Tordai, A. Varadi, A. Racz, K. Esik, O. *Genotype-phenotype correlations in Hungarian patients with hereditary medullary thyroid cancer*. *Wiener Klinische Wochenschrift Vol: 118 Pages: 417-421*. (2006).
- [11] Patocs, A. Valkusz, Z. Igaz, P. Balogh, K. Toth, M. Varga, I. Racz, K. *Segregation of the V804L mutation and S836S polymorphism of exon 14 of the RET gene in an extended kindred with familial medullary thyroid cancer*. *Clinical Genetics Vol: 63, Pages: 219-223* (2003).
- [12] Csányi V., *Viselkedés*. In *Etológia*. pp. 135-145, Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest 2002.
- [13] A. Chakravarti, P. Little: *Nature, nurture and human disease*. *Nature*. 421:412-414 (2003).
- [14] P. A. Jones: *Death and metilation*. *Nature*. 409:141-144 (2001).

- [15] Csányi V., *Viselkedés és homeosztázis*. In *Etológia*. pp. 149-157, Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest 2002.
- [16] Csányi V., *Viselkedésmintázatok*. In *Etológia*. pp. 165-185, Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest 2002.
- [17] K. Pilkington, G. Kirkwood, H. Rampes, P. Fisher and J. Richardson, *Homeopathy for anxiety and anxiety disorders: a systematic review of the research*. Homeopathy 95, 151-162 (2006).
- [18] A. Ennaceur, S. Michalikova and P. L. Chazot, *Models of anxiety: responses of rats to novelty in an open space and an enclosed space*. Behav Brain Res 171, 26-49 (2006).
- [19] R. J. Blanchard, P. M. Wall and D. C. Blanchard, *Problems in the study of rodent aggression*. Horm Behav 44, 161-170 (2003).
- [20] Csányi V., *Agresszió*. In *Etológia*. pp. 205-245, Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest 2002.
- [21] E. Vermetten and J. D. Bremner, *Circuits and systems in stress. II. Applications to neurobiology and treatment in posttraumatic stress disorder*. Depress Anxiety 16, 14-38 (2002).
- [22] R. J. Blanchard and D. C. Blanchard, *Aggressive behavior in the rat*. Behav Biol 21, 197-224 (1977).
- [23] T. R. Gregg and A. Siegel, *Brain structures and neurotransmitters regulating aggression in cats: implications for human aggression*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 25, 91-140 (2001).
- [24] K. Breivik, R. Alcock, Y. F. Li, R. E. Bailey, H. Fiedler and J. M. Pacyna, *Primary sources of selected POPs: regional and global scale emission inventories*. Environ Pollut 128, 3-16 (2004).
- [25] M. Weselak, T. E. Arbuckle and W. Foster, *Pesticide exposures and developmental outcomes: the epidemiological evidence*. J Toxicol Environ Health B Crit Rev 10, 41-80 (2007).
- [26] T. Colborn, F. S. vom Saal and A. M. Soto, *Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans*. Environ Health Perspect 101, 378-384 (1993).
- [27] B. M. Jenssen, *Endocrine-disrupting chemicals and climate change: A worst-case combination for arctic marine mammals and seabirds?* Environ Health Perspect 114 Suppl 1, 76-80 (2006).

- [28] S. M. Zala and D. J. Penn, *Abnormal behaviours induced by chemical pollution: a review of the evidence and new challenges*. *Animal Behaviour* 68, 649-664 (2004).
- [29] O. Faroon, D. Jones and C. de Rosa, *Effects of polychlorinated biphenyls on the nervous system*. *Toxicol Ind Health* 16, 305-333 (2001).
- [30] H. J. Vreugdenhil, F. M. Slijper, P. G. Mulder and N. Weisglas-Kuperus, *Effects of perinatal exposure to PCBs and dioxins on play behavior in Dutch children at school age*. *Environ Health Perspect* 110, A593-A598 (2002).
- [31] P. Plusquellec, G. Muckle, E. Dewailly, P. Ayotte, G. Begin, C. Desrosiers, C. Despres, D. Saint-Amour and K. Poitras, *The relation of environmental contaminants exposure to behavioral indicators in Inuit preschoolers in Arctic Quebec*. *Neurotoxicology* (2009).
- [32] J. L. Jacobson and S. W. Jacobson, *Prenatal exposure to polychlorinated biphenyls and attention at school age*. *J Pediatr* 143, 780-788 (2003).
- [33] J. L. Jacobson, S. W. Jacobson, R. J. Padgett, G. A. Brumitt and R. L. Billings, *Effects of Prenatal Pcb Exposure on Cognitive Processing Efficiency and Sustained Attention*. *Developmental Psychology* 28, 297-306 (1992).
- [31] Csányi V., *Viselkedés*. In *Etológia*. pp. 135-145, Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest 2002.
- [32] Csányi V., *Viselkedés és homeosztázis*. In *Etológia*. pp. 149-157, Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest 2002.
- [33] Csányi V., *Viselkedésmintázatok*. In *Etológia*. pp. 165-185, Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest 2002.
- [34] Stoker TE, Parks LG, Gray LE, Cooper RL. Endocrine-disrupting chemicals: prepubertal exposures and effects on sexual maturation and thyroid function in the male rat. A focus on the EDSTAC recommendations. *Endocrine Disrupter Screening and Testing Advisory Committee. Crit Rev Toxicol.* 30(2):197-252. (2000).
- [35] J. L. Barber, A. J. Sweetman, D. van Wijk and K. C. Jones, *Hexachlorobenzene in the global environment: emissions, levels, distribution, trends and processes*. *Sci Total Environ* 349, 1-44 (2005).
- [36] S. Hadjab, D. Maurel, Y. Cazals and P. Siaud, *Hexachlorobenzene, a dioxin-like compound, disrupts auditory function in rat*. *Hear Res* 191, 125-134 (2004).
- [37] Furka A., *Aromás szénhidrogének*. In *Szerves Kémia*. (Ed. Furka A.) pp. 249-274, Tankönyvkiadó Budapest, Budapest 1988.
- [38] R. E. Bailey, *Global hexachlorobenzene emissions*. *Chemosphere* 43, 167-182 (2001).

- [39] S. A. Korrick and S. K. Sagiv, *Polychlorinated biphenyls, organochlorine pesticides and neurodevelopment*. Curr Opin Pediatr 20, 198-204 (2008).
- [40] L. Reed, V. Buchner and P. B. Tchounwou, *Environmental toxicology and health effects associated with hexachlorobenzene exposure*. Rev Environ Health 22, 213-243 (2007).
- [41] M. R. Bleavins, S. J. Bursian, J. S. Brewster and R. J. Aulerich, *Effects of dietary hexachlorobenzene exposure on regional brain biogenic amine concentrations in mink and European ferrets*. J Toxicol Environ Health 14, 363-377 (1984).
- [42] E. S. Goldey and D. H. Taylor, *Developmental neurotoxicity following prenatally maternal exposure to hexachlorobenzene in rats*. Neurotoxicol Teratol 14, 15-21 (1992).
- [43] H. Lilienthal, C. Bente, B. Heinzow and G. Winneke, *Impairment of schedule-controlled behavior by pre- and postnatal exposure to hexachlorobenzene in rats*. Arch Toxicol 70, 174-181 (1996).
- [44] A. M. Evangelista de Duffard and R. Duffard, *Behavioral toxicology, risk assessment, and chlorinated hydrocarbons*. Environ Health Perspect 104 Suppl 2, 353-360 (1996).
- [45] N. Ribas-Fito, E. Cardo, M. Sala, d. M. Eulalia, C. Mazon, A. Verdu, M. Kogevinas, J. O. Grimalt and J. Sunyer, *Breastfeeding, exposure to organochlorine compounds, and neurodevelopment in infants*. Pediatrics 111, e580-e585 (2003).
- [46] N. Ribas-Fito, M. Torrent, D. Carrizo, J. Julvez, J. O. Grimalt and J. Sunyer, *Exposure to hexachlorobenzene during pregnancy and children's social behavior at 4 years of age*. Environ Health Perspect 115, 447-450 (2007).
- [47] M. Sala, N. Ribas-Fito, E. Cardo, M. E. de Muga, E. Marco, C. Mazon, A. Verdu, J. O. Grimalt and J. Sunyer, *Levels of hexachlorobenzene and other organochlorine compounds in cord blood: exposure across placenta*. Chemosphere 43, 895-901 (2001).
- [48] H. A. Peters, D. J. Cripps, A. Gocmen, E. Erturk, G. T. Bryan and C. R. Morris, *Neurotoxicity of hexachlorobenzene-induced porphyria turcica*. IARC Sci Publ 575-579 (1986).
- [49] R. L. Sufit, R. Hodach, R. Arends, H. A. Peters, E. Erturk and D. J. Cripps, *Decreased conduction velocity and pseudomyotonia in hexachlorobenzene-fed rats*. IARC Sci Publ 361-362 (1986).
- [50] H. S. Jorgensen, *Studies on the neuroendocrine role of serotonin*. Dan Med Bull 54, 266-288 (2007).
- [51] Szentágothai J. and Réthelyi M., *Központi idegrendszer*. In *Funkcionális anatómia III*. (Ed. Szentágothai J. and Réthelyi M.) Medicina, 2002.

- [52] Világi I., *A biogén aminok transzmitterrendszere*. In *Neurokémia*. pp. 177-192, Dialóg Campus, Budapest-Pécs 2003.
- [53] G. Fink, B. E. Sumner, J. K. McQueen, H. Wilson and R. Rosie, *Sex steroid control of mood, mental state and memory*. Clin Exp Pharmacol Physiol 25, 764-775 (1998).
- [54] S. N. Young, R. O. Pihl, C. Benkelfat, R. Palmour, M. Ellenbogen and D. Lemarquand, *The effect of low brain serotonin on mood and aggression in humans. Influence of baseline mood and genetic factors*. Adv Exp Med Biol 398, 45-50 (1996).
- [55] F. G. Graeff, M. B. Viana and P. O. Mora, *Dual role of 5-HT in defense and anxiety*. Neurosci Biobehav Rev 21, 791-799 (1997).
- [56] A. D. Levy and L. D. Van de Kar, *Endocrine and receptor pharmacology of serotonergic anxiolytics, antipsychotics and antidepressants*. Life Sci 51, 83-94 (1992).
- [57] P. O. Mora, C. F. Netto and F. G. Graeff, *Role of 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptor subtypes in the two types of fear generated by the elevated T-maze*. Pharmacol Biochem Behav 58, 1051-1057 (1997).
- [58] D. Verge and A. Calas, *Serotonergic neurons and serotonin receptors: gains from cytochemical approaches*. J Chem Neuroanat 18, 41-56 (2000).
- [59] E. H. Turner, J. M. Loftis and A. D. Blackwell, *Serotonin a la carte: supplementation with the serotonin precursor 5-hydroxytryptophan*. Pharmacol Ther 109, 325-338 (2006).
- [60] B. L. Jacobs and E. C. Azmitia, *Structure and function of the brain serotonin system*. Physiol Rev 72, 165-229 (1992).
- [61] Baranyai A., Erdélyi L., Fehér O. and Nemcsók J., *A szerotoninerg neuronok*. In *Molekuláris fiziológia*. pp. 130-132, JATE, Szeged 1990.
- [62] A. Dahlstroem and K. Fuxe, *evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. i. demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons*. Acta Physiol Scand Suppl -55 (1964).
- [63] T. Petrov, T. L. Krukoff and J. H. Jhamandas, *Chemically defined collateral projections from the pons to the central nucleus of the amygdala and hypothalamic paraventricular nucleus in the rat*. Cell Tissue Res 277, 289-295 (1994).
- [64] N. K. Popova, *From genes to aggressive behavior: the role of serotonergic system*. Bioessays 28, 495-503 (2006).
- [65] D. Hoyer, D. E. Clarke, J. R. Fozard, P. R. Hartig, G. R. Martin, E. J. Mylecharane, P. R. Saxena and P. P. Humphrey, *International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin)*. Pharmacol Rev 46, 157-203 (1994).

- [66] P. R. Albert and M. Tiberi, *Receptor signaling and structure: insights from serotonin-1 receptors*. Trends Endocrinol Metab 12, 453-460 (2001).
- [67] D. Hoyer, J. P. Hannon and G. R. Martin, *Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors*. Pharmacol Biochem Behav 71, 533-554 (2002).
- [68] C. H. Summers, W. J. Korzan, J. L. Lukkes, M. J. Watt, G. L. Forster, O. Overli, E. Hoglund, E. T. Larson, P. J. Ronan, J. M. Matter, T. R. Summers, K. J. Renner and N. Greenberg, *Does serotonin influence aggression? comparing regional activity before and during social interaction*. Physiol Biochem Zool 78, 679-694 (2005).
- [69] R. Mongeau, P. Blier and C. de Montigny, *The serotonergic and noradrenergic systems of the hippocampus: their interactions and the effects of antidepressant treatments*. Brain Res Brain Res Rev 23, 145-195 (1997).
- [70] R. M. de Almeida, P. F. Ferrari, S. Parmigiani and K. A. Miczek, *Escalated aggressive behavior: dopamine, serotonin and GABA*. Eur J Pharmacol 526, 51-64 (2005).
- [71] L. R. Baxter, Jr., *Brain mediation of Anolis social dominance displays. III. Differential forebrain 3H-sumatriptan binding in dominant vs. submissive males*. Brain Behav Evol 57, 202-213 (2001).
- [72] L. R. Baxter, Jr., E. C. Clark, R. F. Ackermann, G. Lacan and W. P. Melega, *Brain mediation of Anolis social dominance displays. II. Differential forebrain serotonin turnover, and effects of specific 5-HT receptor agonists*. Brain Behav Evol 57, 184-201 (2001).
- [73] Fehér O., *Noradrenalin, adrenalin*. In *Pszichofarmakológia*. pp. 127-135, Jatepress, Szeged 2003.
- [74] A. Anand and D. S. Charney, *Norepinephrine dysfunction in depression*. J Clin Psychiatry 61 Suppl 10, 16-24 (2000).
- [75] A. S. Elhwuegi, *Central monoamines and their role in major depression*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 28, 435-451 (2004).
- [76] K. A. Miczek, E. W. Fish, J. F. De Bold and R. M. de Almeida, *Social and neural determinants of aggressive behavior: pharmacotherapeutic targets at serotonin, dopamine and gamma-aminobutyric acid systems*. Psychopharmacology (Berl) 163, 434-458 (2002).
- [77] B. J. van der Vegt, N. Lieuwes, T. I. Cremers, S. F. de Boer and J. M. Koolhaas, *Cerebrospinal fluid monoamine and metabolite concentrations and aggression in rats*. Horm Behav 44, 199-208 (2003).
- [78] Szentágothai J. and Réthelyi M., *A környéki idegrendszer*. In *Funkcionális anatómia III*. pp. 1609-1670, Medicina, Budapest 2002.

- [79] J. T. Coull, *Pharmacological manipulations of the alpha 2-noradrenergic system. Effects on cognition*. *Drugs Aging* 5, 116-126 (1994).
- [80] Redmond D., *Studies of the nucleus locus ceruleus in monkeys and hypothesis for neuropsychopharmacology*. In *Psychopharmacology: The Third Generation of Progress*. (Ed. Meltzer H.) pp. 967-975, Raven Press, New York 1987.
- [81] N. Herrmann, K. L. Lanctot and L. R. Khan, *The role of norepinephrine in the behavioral and psychological symptoms of dementia*. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 16, 261-276 (2004).
- [82] G. A. Carrasco and L. D. Van de Kar, *Neuroendocrine pharmacology of stress*. *Eur J Pharmacol* 463, 235-272 (2003).
- [83] E. J. Nestler, M. Alreja and G. K. Aghajanian, *Molecular control of locus coeruleus neurotransmission*. *Biol Psychiatry* 46, 1131-1139 (1999).
- [84] E. T. Cunningham, Jr. and P. E. Sawchenko, *Anatomical specificity of noradrenergic inputs to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat hypothalamus*. *J Comp Neurol* 274, 60-76 (1988).
- [85] M. Palkovits, *Interconnections between the neuroendocrine hypothalamus and the central autonomic system. Geoffrey Harris Memorial Lecture, Kitakyushu, Japan, October 1998*. *Front Neuroendocrinol* 20, 270-295 (1999).
- [86] M. Palkovits, J. S. Baffi and K. Pacak, *The role of ascending neuronal pathways in stress-induced release of noradrenaline in the hypothalamic paraventricular nucleus of rats*. *J Neuroendocrinol* 11, 529-539 (1999).
- [87] H. Jorgensen, A. Kjaer, U. Knigge, M. Moller and J. Warberg, *Serotonin stimulates hypothalamic mRNA expression and local release of neurohypophysial peptides*. *J Neuroendocrinol* 15, 564-571 (2003).
- [88] C. M. Vacher, P. Fretier, C. Creminon, A. Calas and H. Hardin-Pouzet, *Activation by serotonin and noradrenaline of vasopressin and oxytocin expression in the mouse paraventricular and supraoptic nuclei*. *J Neurosci* 22, 1513-1522 (2002).
- [89] J. L. Abelson, D. Glitz, O. G. Cameron, M. A. Lee, M. Bronzo and G. C. Curtis, *Blunted growth hormone response to clonidine in patients with generalized anxiety disorder*. *Arch Gen Psychiatry* 48, 157-162 (1991).
- [90] D. J. Nutt, *Neurobiological mechanisms in generalized anxiety disorder*. *J Clin Psychiatry* 62 Suppl 11, 22-27 (2001).
- [91] G. Gerra, A. Zaimovic, P. Avanzini, B. Chittolini, G. Giucastro, R. Caccavari, M. Palladino, D. Maestri, C. Monica, R. Delsignore and F. Brambilla, *Neurotransmitter-neuroendocrine responses to experimentally induced aggression in humans: influence of personality variable*. *Psychiatry Res* 66, 33-43 (1997).

- [92] J. Haller, G. B. Makara and M. R. Kruk, *Catecholaminergic involvement in the control of aggression: hormones, the peripheral sympathetic, and central noradrenergic systems*. *Neurosci Biobehav Rev* 22, 85-97 (1998).
- [93] D. E. Redmond, Jr., M. M. Katz, J. W. Maas, A. Swann, R. Casper and J. M. Davis, *Cerebrospinal fluid amine metabolites. Relationships with behavioral measurements in depressed, manic, and healthy control subjects*. *Arch Gen Psychiatry* 43, 938-947 (1986).
- [94] A. C. Swann, S. K. Secunda, S. H. Koslow, M. M. Katz, C. L. Bowden, J. W. Maas, J. M. Davis and E. Robins, *Mania: sympathoadrenal function and clinical state*. *Psychiatry Res* 37, 195-205 (1991).
- [95] Eichelman B., *Neurochemical and psychopharmacologic aspects of aggressive behavior*. In *Psychopharmacology: The Third Generation of Progress*. (Ed. Meltzer H.) pp. 697-704, Raven Press New York 1987.
- [96] G. L. Brown, F. K. Goodwin, J. C. Ballenger, P. F. Goyer and L. F. Major, *Aggression in humans correlates with cerebrospinal fluid amine metabolites*. *Psychiatry Res* 1, 131-139 (1979).
- [97] G. Gerra, P. Avanzini, A. Zaimovic, G. Fertonani, R. Caccavari, R. Delsignore, F. Gardini, E. Talarico, R. Lecchini, D. Maestri and F. Brambilla, *Neurotransmitter and endocrine modulation of aggressive behavior and its components in normal humans*. *Behav Brain Res* 81, 19-24 (1996).
- [98] E. F. Coccaro, T. Lawrence, R. Trestman, S. Gabriel, H. M. Klar and L. J. Siever, *Growth hormone responses to intravenous clonidine challenge correlate with behavioral irritability in psychiatric patients and healthy volunteers*. *Psychiatry Res* 39, 129-139 (1991).
- [99] J. P. Burbach, S. M. Luckman, D. Murphy and H. Gainer, *Gene regulation in the magnocellular hypothalamo-neurohypophysial system*. *Physiol Rev* 81, 1197-1267 (2001).
- [100] S. Reichlin, *Neuroendocrinology of the pituitary gland*. *Toxicol Pathol* 17, 250-255 (1989).
- [101] C. H. Rhodes, J. I. Morrell and D. W. Pfaff, *Immunohistochemical analysis of magnocellular elements in rat hypothalamus: distribution and numbers of cells containing neurophysin, oxytocin, and vasopressin*. *J Comp Neurol* 198, 45-64 (1981).
- [102] H. Gainer, *Cell-specific gene expression in oxytocin and vasopressin magnocellular neurons*. *Adv Exp Med Biol* 449, 15-27 (1998).
- [103] T. Murakami, A. Kikuta, T. Taguchi, A. Ohtsuka and O. Ohtani, *Blood vascular architecture of the rat cerebral hypophysis and hypothalamus. A dissection/scanning electron microscopy of vascular casts*. *Arch Histol Jpn* 50, 133-176 (1987).

- [104] P. E. Sawchenko and L. W. Swanson, *Immunohistochemical identification of neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus that project to the medulla or to the spinal cord in the rat*. J Comp Neurol 205, 260-272 (1982).
- [105] F. Vandesande, K. Dierickx and J. De Mey, *The origin of the vasopressinergic and oxytocinergic fibres of the external region of the median eminence of the rat hypophysis*. Cell Tissue Res 180, 443-452 (1977).
- [106] R. M. Buijs and D. F. Swaab, *Immuno-electron microscopical demonstration of vasopressin and oxytocin synapses in the limbic system of the rat*. Cell Tissue Res 204, 355-365 (1979).
- [107] J. O. Streefkerk, M. Pfaffendorf and P. A. van Zwieten, *Endothelium-dependent, vasopressin-induced contractions in rabbit renal arteries*. J Cardiovasc Pharmacol 42, 703-709 (2003).
- [108] C. L. Holmes, D. W. Landry and J. T. Granton, *Science review: Vasopressin and the cardiovascular system part 1--receptor physiology*. Crit Care 7, 427-434 (2003).
- [109] Fehér O., *Peptid átvivő anyagok*. In *Pszichofarmakológia*. pp. 147-167, Jatepress, Szeged 2003.
- [110] Fehér O., *Vasopresszin-ADH és oxitocin*. In *Pszichofarmakológia*. pp. 150-153, Jatepress, Szeged 2003.
- [111] J. A. Majzoub, A. Pappey, R. Burg and J. F. Habener, *Vasopressin gene is expressed at low levels in the hypothalamus of the Brattleboro rat*. Proc Natl Acad Sci U S A 81, 5296-5299 (1984).
- [112] J. A. Majzoub, E. J. Carrazana, J. S. Shulman, K. J. Baker and R. L. Emanuel, *Defective regulation of vasopressin gene expression in Brattleboro rats*. Am J Physiol 252, E637-E642 (1987).
- [113] M. Morris and N. Alexander, *Baroreceptor influences on oxytocin and vasopressin secretion*. Hypertension 13, 110-114 (1989).
- [114] L. W. Swanson and P. E. Sawchenko, *Hypothalamic integration: organization of the paraventricular and supraoptic nuclei*. Annu Rev Neurosci 6, 269-324 (1983).
- [115] T. Mouri, K. Itoi, K. Takahashi, T. Suda, O. Murakami, K. Yoshinaga, N. Andoh, H. Ohtani, T. Masuda and N. Sasano, *Colocalization of corticotropin-releasing factor and vasopressin in the paraventricular nucleus of the human hypothalamus*. Neuroendocrinology 57, 34-39 (1993).
- [116] F. Hernando, O. Schoots, S. J. Lolait and J. P. Burbach, *Immunohistochemical localization of the vasopressin V1b receptor in the rat brain and pituitary gland: anatomical support for its involvement in the central effects of vasopressin*. Endocrinology 142, 1659-1668 (2001).

- [117] Galfi, M. Khalil WKA, Valkusz, Z. Gaspar, L. Juhasz, A. Julesz, J. Molnar, J. *Functional membrane changes due to tumor induction in rat pituitary cell cultures*. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research Vol: 19 Pages: 531-535. (2000).
- [118] F. W. van Leeuwen, D. F. Swaab and C. de Raay, *Immunoelectronmicroscopic localization of vasopressin in the rat suprachiasmatic nucleus*. Cell Tissue Res 193, 1-10 (1978).
- [119] M. A. Miller, R. T. Zoeller and D. M. Dorsa, *Detection of vasopressin messenger RNA in cells within the bed nucleus of the stria terminalis by in situ hybridization histochemistry*. Neurosci Lett 94, 264-268 (1988).
- [120] D. M. Dorsa, M. D. Brot, L. M. Shewey, K. M. Meyers, P. Szot and M. A. Miller, *Interaction of a vasopressin antagonist with vasopressin receptors in the septum of the rat brain*. Synapse 2, 205-211 (1988).
- [121] Swanson L.W., *The hypothalamus*. In *Handbook of Chemical Neuroanatomy: Integrated Systems of the CNS*. (Ed. Bjorklund A., Hokfelt T. and Swanson L.W.) pp. 1-124, Elsevier, Amsterdam 1987.
- [122] F. Loup, E. Tribollet, M. Dubois-Dauphin and J. J. Dreifuss, *Localization of high-affinity binding sites for oxytocin and vasopressin in the human brain. An autoradiographic study*. Brain Res 555, 220-232 (1991).
- [123] Tribollet E., *Vasopressin and oxytocin receptors in the rat brain*. In *Handbook of chemical neuroanatomy*. (Ed. Björklund A, Hökfelt T and Kuhar M.J) pp. 289-320, Elsevier, New York 1992.
- [124] M. J. Brownstein, J. T. Russell and H. Gainer, *Synthesis, transport, and release of posterior pituitary hormones*. Science 207, 373-378 (1980).
- [125] M. Birnbaumer, *Vasopressin receptors*. Trends Endocrinol Metab 11, 406-410 (2000).
- [126] K. Ebner, C. T. Wotjak, R. Landgraf and M. Engelmann, *A single social defeat experience selectively stimulates the release of oxytocin, but not vasopressin, within the septal brain area of male rats*. Brain Res 872, 87-92 (2000).
- [127] I. F. Bielsky, S. B. Hu, K. L. Szegda, H. Westphal and L. J. Young, *Profound impairment in social recognition and reduction in anxiety-like behavior in vasopressin V1a receptor knockout mice*. Neuropsychopharmacology 29, 483-493 (2004).
- [128] A. Wigger, M. M. Sanchez, K. C. Mathys, K. Ebner, E. Frank, D. Liu, A. Kresse, I. D. Neumann, F. Holsboer, P. M. Plotsky and R. Landgraf, *Alterations in central neuropeptide expression, release, and receptor binding in rats bred for high anxiety: critical role of vasopressin*. Neuropsychopharmacology 29, 1-14 (2004).
- [129] L. J. Pitkow, C. A. Sharer, X. Ren, T. R. Insel, E. F. Terwilliger and L. J. Young, *Facilitation of affiliation and pair-bond formation by vasopressin receptor*

gene transfer into the ventral forebrain of a monogamous vole. *J Neurosci* 21, 7392-7396 (2001).

[130] N. Egashira, K. Mishima, K. Iwasaki, R. Oishi and M. Fujiwara, *New topics in vasopressin receptors and approach to novel drugs: role of the vasopressin receptor in psychological and cognitive functions*. *J Pharmacol Sci* 109, 44-49 (2009).

[131] G. Aguilera and C. Rabadan-Diehl, *Regulation of vasopressin V1b receptors in the anterior pituitary gland of the rat*. *Exp Physiol* 85 Spec No, 19S-26S (2000).

[132] G. Aguilera, C. Rabadan-Diehl and M. Nikodemova, *Regulation of pituitary corticotropin releasing hormone receptors*. *Peptides* 22, 769-774 (2001).

[133] C. Rabadan-Diehl, S. J. Lolait and G. Aguilera, *Regulation of pituitary vasopressin V1b receptor mRNA during stress in the rat*. *J Neuroendocrinol* 7, 903-910 (1995).

[134] E. F. Coccaro, R. J. Kavoussi, R. L. Hauger, T. B. Cooper and C. F. Ferris, *Cerebrospinal fluid vasopressin levels: correlates with aggression and serotonin function in personality-disordered subjects*. *Arch Gen Psychiatry* 55, 708-714 (1998).

[135] K. L. Gobrogge, Y. Liu, X. Jia and Z. Wang, *Anterior hypothalamic neural activation and neurochemical associations with aggression in pair-bonded male prairie voles*. *J Comp Neurol* 502, 1109-1122 (2007).

[136] S. R. Wersinger, H. K. Caldwell, M. Christiansen and W. S. Young, III, *Disruption of the vasopressin 1b receptor gene impairs the attack component of aggressive behavior in mice*. *Genes Brain Behav* 6, 653-660 (2007).

[137] A. S. McNeilly, I. C. Robinson, M. J. Houston and P. W. Howie, *Release of oxytocin and prolactin in response to suckling*. *Br Med J (Clin Res Ed)* 286, 257-259 (1983).

[138] K. Furuya, Y. Mizumoto, N. Makimura, C. Mitsui, M. Murakami, S. Tokuoka, N. Ishikawa, E. Imaizumi, E. Katayama, K. Seki and ., *Gene expressions of oxytocin and oxytocin receptor in cumulus cells of human ovary*. *Horm Res* 44 Suppl 2, 47-49 (1995).

[139] J. Frayne and H. D. Nicholson, *Localization of oxytocin receptors in the human and macaque monkey male reproductive tracts: evidence for a physiological role of oxytocin in the male*. *Mol Hum Reprod* 4, 527-532 (1998).

[140] W. Huang, S. L. Lee, S. S. Arnason and M. Sjoquist, *Dehydration natriuresis in male rats is mediated by oxytocin*. *Am J Physiol* 270, R427-R433 (1996).

[141] U. M. Moll, B. L. Lane, F. Robert, V. Geenen and J. J. Legros, *The neuroendocrine thymus. Abundant occurrence of oxytocin-, vasopressin-, and neurophysin-like peptides in epithelial cells*. *Histochemistry* 89, 385-390 (1988).

- [142] K. Hanif, K. Lederis, M. D. Hollenberg and H. J. Goren, *Inability of oxytocin to activate pyruvate dehydrogenase in the Brattleboro rat*. Science 216, 1010-1012 (1982).
- [143] B. E. Dunning, J. H. Moltz and C. P. Fawcett, *Modulation of insulin and glucagon secretion from the perfused rat pancreas by the neurohypophysial hormones and by desamino-D-arginine vasopressin (DDAVP)*. Peptides 5, 871-875 (1984).
- [144] J. Hawthorn, S. S. Nussey, J. R. Henderson and J. S. Jenkins, *Immunohistochemical localization of oxytocin and vasopressin in the adrenal glands of rat, cow, hamster and guinea pig*. Cell Tissue Res 250, 1-6 (1987).
- [145] T. Kimura, O. Tanizawa, K. Mori, M. J. Brownstein and H. Okayama, *Structure and expression of a human oxytocin receptor*. Nature 356, 526-529 (1992).
- [146] D. A. Brown and T. S. Sihra, *Presynaptic signaling by heterotrimeric G-proteins*. Handb Exp Pharmacol 207-260 (2008).
- [147] A. K. Ragnauth, N. Devidze, V. Moy, K. Finley, A. Goodwillie, L. M. Kow, L. J. Muglia and D. W. Pfaff, *Female oxytocin gene-knockout mice, in a semi-natural environment, display exaggerated aggressive behavior*. Genes Brain Behav 4, 229-239 (2005).
- [148] A. Ermisch, T. Barth, H. J. Ruhle, J. Skopkova, P. Hrbas and R. Landgraf, *On the blood-brain barrier to peptides: accumulation of labelled vasopressin, DesGlyNH₂-vasopressin and oxytocin by brain regions*. Endocrinol Exp 19, 29-37 (1985).
- [149] J. T. Winslow and T. R. Insel, *The social deficits of the oxytocin knockout mouse*. Neuropeptides 36, 221-229 (2002).
- [150] M. Kosfeld, M. Heinrichs, P. J. Zak, U. Fischbacher and E. Fehr, *Oxytocin increases trust in humans*. Nature 435, 673-676 (2005).
- [151] P. J. Zak, A. A. Stanton and S. Ahmadi, *Oxytocin increases generosity in humans*. PLoS One 2, e1128 (2007).
- [152] J. A. Amico, R. C. Mantella, R. R. Vollmer and X. Li, *Anxiety and stress responses in female oxytocin deficient mice*. J Neuroendocrinol 16, 319-324 (2004).
- [153] I. D. Neumann, *Brain oxytocin: a key regulator of emotional and social behaviours in both females and males*. J Neuroendocrinol 20, 858-865 (2008).
- [154] M. Waldherr and I. D. Neumann, *Centrally released oxytocin mediates mating-induced anxiolysis in male rats*. Proc Natl Acad Sci U S A 104, 16681-16684 (2007).
- [155] P. Kirsch, C. Esslinger, Q. Chen, D. Mier, S. Lis, S. Siddhanti, H. Gruppe, V. S. Mattay, B. Gallhofer and A. Meyer-Lindenberg, *Oxytocin modulates neural circuitry for social cognition and fear in humans*. J Neurosci 25, 11489-11493 (2005).

- [156] C. W. Nogueira, L. P. Borges and A. C. G. Souza, *Oral administration of diphenyl diselenide potentiates hepatotoxicity induced by carbon tetrachloride in rats*. Journal of Applied Toxicology 29, 156-164 (2009).
- [157] Laczi, F. Vanree, JM. Balogh, L. Szasz, A. Jardanhazy, T. Wagner, A. Gaspar, L. Valkusz, Z. Szilárd, J. Laszlo, FA. Dewied, D. *Lack of effect of "desglycinamide-arginine-vasopressin (dgavp) on memory in patients with korsakoffs syndrome*. Acta Endocrinologica Vol: 104 Pages: 177-182. (1983).
- [158] E. Sipos, A. Kurunczi, A. Kasza, J. Horvath, K. Felszeghy, S. Laroche, J. Toldi, A. Parducz, B. Penke and Z. Penke, *beta-amyloid pathology in the entorhinal cortex of rats induces memory deficits: Implications for Alzheimer's disease*. Neuroscience 147, 28-36 (2007).
- [159] P. Klivenyi, Z. Bende, Z. Hartai, Z. Penke, H. Nemeth, J. Toldi and L. Vecsei, *Behaviour changes in a transgenic model of Huntington's disease*. Behavioural Brain Research 169, 137-141 (2006).
- [160] E. Biro, B. Penke and G. Telegdy, *Role of different neurotransmitter systems in the cholecystokinin octapeptide-induced anxiogenic response in rats*. Neuropeptides 31, 281-285 (1997).
- [161] P. M. Wall and C. Messier, *Ethological confirmatory factor analysis of anxiety-like behaviour in the murine elevated plus-maze*. Behav Brain Res 114, 199-212 (2000).
- [162] E. Mikics, M. R. Kruk and J. Haller, *Genomic and non-genomic effects of glucocorticoids on aggressive behavior in male rats*. Psychoneuroendocrinology 29, 618-635 (2004).
- [163] T. Janaky, P. Szabo, Z. Kele, L. Balaspiri, C. Varga, M. Galfi, M. Vecsernyes, L. Gaspar, A. Juhasz and F. A. Laszlo, *Identification of oxytocin and vasopressin from neurohypophyseal cell culture*. Rapid Commun Mass Spectrom 12, 1765-1768 (1998).
- [164] László F.A., Gálfi M., Jójárt I., Vecsernyés M., Laczi F., and Maderspach K.: *Neurohypophysis tissue cultured as a model of hormonal activity of rat pituicytes*. J. of. Neuroend. (Int. IV.th. Conf. Neurohyph. Copenhagen). p: 87-91. (1989).
- [165] Galfi, M. Valkusz, Z. Molnar, J. Gardi, J. Toth, I. Julesz, J. Szarvas, F. *The effects of phenothiazine-derivatives on the exocytotic activities of pituitary prolactinoma and leydig-cell cultures of the rat*. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research Vol: 14 Pages: 30-31. Suppl. S (1995).
- [166] Gálfi, M. Valkusz, Z. Molnár, J.. Gardi, J Tóth, I. Szervas, F. Juhász, A. Julesz, J.: *The effects of Phenithiazine derivatives on the exocytotic activities of pituitary prolactinoma and leydig cell cultures of the rat*. Journal of Experimental and Clinical Cancer Research 14:30-32 (1995).

- [167] Valkusz, Z. Gálfi, M. Molnár, J. Gardi, J. Tóth, I.J. Julesz, F. Szarvas: *The effects of phenothiazine Derivatives on the membrane functions of cultured Leydig cells of rats*. Journal of Experimental and Clinical Cancer Research 14:28-30 (1995)
- [168] Valkusz, Z. Gálfi, M. Julesz, J. Juhász, A. Balogh, É. Tóth, I. Prohászka, G. Molnár, J.: *Phenothiazine-induced changes in hormone release from various endocrine cell cultures of the rat*. In: Biological and Chemical aspects of thiazines and analogs. Eds.: H. Keyzer and J. C. Soyfer. San Gabriel, California. p: 427-431. (1995).
- [169] Gálfi, M. Valkusz, Z. Julesz, J. Juhász, A. Hódi, Z. Balogh, É. Gardi, J. Molnár J.: *Effects of phenothiazines on ACTH secretion in normal pituitary- and prolactinoma-derived cell cultures of the rat*. In: Biological and chemical aspects of thiazines and analogs. Eds.: H. Keyzer and J. C. Soyfer. San Gabriel, California p: 419-425. (1995).
- [170] F. Laczi, T. Ivanyi, J. Julesz, T. Janaky and F. A. Laszlo, *Plasma arginine-8-vasopressin responses to osmotic or histamine stimulation contribute to the differential diagnosis of central diabetes insipidus*. Acta Endocrinol (Copenh) 113, 168-174 (1986).
- [171] J. Dogterom, T. B. Wimersma Greidanus and D. De Wied, *Vasopressin in cerebrospinal fluid and plasma of man, dog, and rat*. Am J Physiol 234, E463-E467 (1978).
- [172] M. Vecsernyes, A. Torok, I. Jojart, F. Laczi, B. Penke and J. Julesz, *Specific radioimmunoassay of oxytocin in rat plasma*. Endocr Regul 28, 145-150 (1994).
- [173] O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall, *Citation Classics - Protein Measurement with Folin Phenol Reagent*. Current Contents 7 (1977).
- [174] D. Suchecki, P. A. Tiba and S. Tufik, *Hormonal and behavioural responses of paradoxical sleep-deprived rats to the elevated plus maze*. J Neuroendocrinol 14, 549-554 (2002).
- [175] W. G. Foster, C. Mertineit, A. Yagminas, A. McMahon and P. Lecavalier, *The Effects of Hexachlorobenzene on Circulating Levels of Adrenal-Steroids in the Ovariectomized Rat*. Journal of Biochemical Toxicology 10, 129-135 (1995).
- [176] T. Colborn, F. S. vom Saal and A. M. Soto, *Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans*. Environ Health Perspect 101, 378-384 (1993).
- [177] C. P. P. C. Michielsen, N. Bloksma, A. Ultee, F. VanMil and J. G. Vos, *Hexachlorobenzene-induced immunomodulation and skin and lung lesions: A comparison between Brown Norway, Lewis, and Wistar rats*. Toxicology and Applied Pharmacology 144, 12-26 (1997).
- [178] D. Adjarov, E. Ivanov and D. Keremidchiev, *Gamma-Glutamyl-Transferase Transferase - A Sensitive Marker in Experimental Hexachlorobenzene Intoxication*. Toxicology 23, 73-77 (1982).

- [179] J. ToFigueras, M. Sala, R. Otero, C. Barrot, M. SantiagoSilva, M. Rodamilans, C. Herrero, J. Grimalt and J. Sunyer, *Metabolism of hexachlorobenzene in humans: Association between serum levels and urinary metabolites in a highly exposed population*. Environmental Health Perspectives 105, 78-83 (1997).
- [180] S. Rotzinger, D. A. Lovejoy and L. A. Tan, *Behavioral effects of neuropeptides in rodent models of depression and anxiety*. Peptides (2009).
- [181] H. K. Caldwell, H. J. Lee, A. H. Macbeth and W. S. Young, *Vasopressin: Behavioral roles of an "original" neuropeptide*. Progress in Neurobiology 84, 1-24 (2008).
- [182] M. Galfi, M. Radacs, A. Juhasz, F. Laszlo, A. Molnar and F. A. Laszlo, *Serotonin-induced enhancement of vasopressin and oxytocin secretion in rat neurohypophyseal tissue culture*. Regul Pept 127, 225-231 (2005).
- [183] M. Radacs, M. Galfi, G. Nagyeri, A. H. Molnar, C. Varga, F. Laszlo and . A. Laszlo, *Significance of the adrenergic system in the regulation of vasopressin secretion in rat neurohypophyseal tissue cultures*. Regul Pept 148, 1-5 (2008)
- [184] N. Egashira, K. Mishima, K. Iwasaki, R. Oishi and M. Fujiwara, *New topics in vasopressin receptors and approach to novel drugs: role of the vasopressin receptor in psychological and cognitive functions*. J Pharmacol Sci 109, 44-49 (2009).
- [185] C. S. de Kloet, E. Vermetten, E. Geuze, V. M. Wiegant and H. G. M. Westenberg, *Elevated plasma arginine vasopressin levels in veterans with posttraumatic stress disorder*. Journal of Psychiatric Research 42, 192-198 (2008).
- [186] M. Altemus, G. Cizza and P. W. Gold, *Chronic Fluoxetine Treatment Reduces Hypothalamic Vasopressin Secretion In vitro*. Brain Research 593, 311-313 (1992).
- [187] G. Scantamburlo, M. Hansenne, S. Fuchs, W. Pitchot, P. Marechal, C. Pequeux, M. Ansseau and J. J. Legros, *Plasma oxytocin levels and anxiety in patients with major depression*. Psychoneuroendocrinology 32, 407-410 (2007).
- [188] H. Jorgensen, U. Knigge, A. Kjaer and J. Warberg, *Serotonergic involvement in stress-induced vasopressin and oxytocin secretion*. European Journal of Endocrinology 147, 815-824 (2002).
- [189] A. H. Veenema and I. D. Neumann, *Neurobiological mechanisms of aggression and stress coping: A comparative study in mouse and rat selection lines*. Brain Behavior and Evolution 70, 274-285 (2007).
- [190] Zs. Valkusz, G. Nagyéri, M. Radács, T. Ocskó, P. Hausinger, M. László, F. A. László, A. Juhász, J. Julesz, R. Pálföldi, M. Gálfi: *Further analysis of behavioral and endocrine consequences of chronic exposure of male Wistar rats to subtoxic doses of endocrine disruptor chlorobenzenes* Physiol Behav. 2011 Jul 6;103(5):421-30. Epub (2011)

[191] G.Nagyri, Z. Valkusz, M. Radacs, T. Ocsko, P. Hausinger, M. Laszlo, F. A. Laszlo, A. Juhasz, J. Julesz, M. Galfi: *Behavioral and endocrine effects of chronic exposure to low doses of chlorobenzenes in Wistar rats* Neurotoxicology and Teratology accepted for publ.

9. Összefoglalás

A homeosztázis révén az élő szervezet egyensúlyi állapotot tart fenn a környezetével, alkalmazkodik a változó külső és belső körülményekhez. Az aktuális egyensúlyi állapot a környezeti paraméterek hatására kialakult biokommunikációs folyamatok változásaként értelmezhető. A hatékony alkalmazkodású élő szervezetek először *neurogén*, majd *neuroendokrin*, ezután *neuroendokrin-immun* és a jelenleg ismert legmagasabb szintű *pszicho- neuroendokrin-immun* kommunikációs akkomodációt mutatnak. A kemikáliák az iparban és a mezőgazdaságban széleskörűen használt vegyületek amelyeket perzisztens, szerves szennyező anyagoknak (POP/Persistent Organic Pollutant vegyületeknek) nevezünk (pl. diklór-difenil-triklór-etán /DDT/, hexaklórbenzol /HCB). A POP vegyületek heterogén csoportjába a hormonháztartást, az endokrin kommunikációt zavaró anyagokat soroljuk, melyeket endokrin diszruptor (EDC) vegyületeknek nevezünk. Az EDC vegyületek viselkedésre vonatkozó hatásainak kutatásából a szexuális viselkedés, az emocionális tónus, a motiváció, a kommunikáció, a szorongás, az agresszió, a dominancia, továbbá a szociális viselkedésformák adatai ismertek. Az EDC vegyületek aktiválhatják vagy gátolhatják az endokrin rendszert, így a hormonok szintézisét, tárolását, felszabadulását, transzportját és metabolizmusát, valamint a receptor felismerést, kötődést, továbbá beleszólhatnak az indukált válaszokat érintő neuroendokrin folyamatokba.

A központi idegrendszerben az endokrin válaszokért és a magatartásfunkciókért felelős struktúrák közösek, így a hormonok gyakran direkt hatással lehetnek a viselkedésre (és fordítva), vagy a metabolizmus módosításán keresztül indirekt módon is befolyásolhatják azt.

(1) Munkánk során az EDC vegyületek közül a halogénezett aromás szénhidrogének csoportjából a *CIB*, *mint modellvegyületeket kívántuk vizsgálni azzal a céllal, hogy ezen a reprezentált vegyületcsoporton keresztül hívjuk fel a figyelmet a veszélyre, amelyet a homeosztatisz rendszerek módosulása közvetíthet*. A CIB a mezőgazdaságban ma már tiltott szerek, bár egyes fejlődő országokban továbbra is használatban vannak. Ipari alkalmazásuk expozíciós korlátokkal (törvényi limitekkel) szabályozott. A CIB legstabilabb lipofil képviselője a HCB. Ennek a xenobiotikum csoportnak alacsonyabb klórszubsztituált, lipofil tulajdonságú származékai is jelen vannak a környezetünkben, amelyek kémiai reaktivitása magasabb a HCB-nál.

(2) Az élő organizmusokat általában több expozíciós ártalom, azaz stressz(hatás) éri egy időben, így *a kombinált kémiai terhelések által kiváltott hatások vizsgálatának tanulmányozására alkalmas kutatási protokoll kialakítását és standardizálását is célunknak*

tekintettük. Kutatásainkban két klórbenzol származékot, a HCB és TCB kombinált hatásainak vizsgálati modellrendszerét kívántuk kidolgozni és standardizálni.

(3) Vizsgálataink során *a kémiai expozíció modellezéséhez kívántunk olyan in vivo kezelési protokollt kidolgozni*, amellyel az akkomodációval fenntartott környezeti-adaptív-potenciál kapacitás megőrzésének értékelésére alkalmas adatokat tudunk nyerni.

(4) Elsősorban *a neuroendokrin homeosztatikus szabályozási rendszerre kifejtett kombinált klórbenzol expozíciós hatások vizsgálatát kívántuk elvégezni* a stresszhormonok közül az OT, az AVP és az ACTH által közvetített akkomodatív reguláció tanulmányozásával.

(5) *A stresszhormonok kombinált expozíciós hatásokra kiváltható elválasztásának tanulmányozásához in vitro modellt kívántunk kialakítani*, amellyel a hormon felszabadulási folyamatok standardizált követése is megvalósítható.

(6) Különösen érdekes kérdésnek tekintettük - a ClB expozíciós limitre vonatkozó törvényi szabályozásai miatt - azt, hogy *az extrém alacsony dózisú kombinált klórbenzol terhelések indukálnak-e változásokat a stresszhormonok neuroendokrin szabályozási folyamataiban*.

(7) A viselkedési mintázatok döntően a neuroendokrin szabályozásban résztvevő hormonok és a sejtek között kommunikáló biogén aminok határozzák meg. Vizsgáltuk, hogy a ClB expozíciója *miként módosíthatja a biogén aminok (5-HT, NA) mediálta OT, VP felszabadulást*.

(8) Tanulmányozni kívántuk, hogy *a biogén aminok és hormonok közvetítette stresszválaszok megváltoztatják-e a gyors alkalmazkodási mintázatot, azaz, az állatok viselkedését*.

(9) Célunk volt annak a kérdésnek a vizsgálata is, hogy *a jogszabályokban engedélyezett expozíciós dózisonál sokkal alacsonyabb dózisú kombinált klórbenzol kezelés okoz-e mérhető viselkedésbeli változásokat a kísérleti állatokban*.

(10) Eredményeink értékelése során választ kerestünk arra, hogy a kutatási protokollok szerint a viselkedési mintázatokban és/vagy a neuroendokrin szabályozásban detektálható változások milyen homeosztatikus mechanizmusokkal hozhatók összefüggésbe.

(11) Választ kerestünk arra is, hogy a ClB modellezett EDC vegyületek milyen további egészségügyi kockázatot jelenthetnek.

(12) Kutatási eredményeink alapján vizsgálni kívántuk, hogy eltérő szabályozás vonatkozzon-e a deponálódó és nem deponálódó EDC vegyületekre.

Eredményeink szerint :

- (1) a szérum AVP mindkét dózis esetében (D1, D2) fokozatosan emelkedett a 60. naptól, amely a 90. napig tartó expozíciót követő méréskor érte el a kontrollhoz viszonyított szignifikáns értéket.

- (2) a szérumban OT már a 60 napos expozíció esetén szignifikánsan emelkedett a kontroll állatokban mért értékekhez képest.
- (3) a szérumban ACTH a D1 és D2 dózis esetén is emelkedett, már 30 napos expozíció után szignifikánssá vált, a kisebb dózis által kiváltott változás csak a 90 napos expozíciónál volt szignifikáns.
- (4) a neurohipofízis VP, OT szekrécióját *in vitro* sejtkultúrákon vizsgálva az alkalmazott D1 D2 dózisú klórbenzol kezelések esetén időfüggően fokozódott a hormonelválasztás.
- (5) a 5-HT és a NA szignifikáns mértékben fokozta *in vitro* a neurohipofízis sejtkultúrák VP és OT elválasztását. A NH monolayer kontroll rendszerekből, és a CIB előkezelésekből készült standardizált sejtenyészeteket 10^{-6} M 5-HT-nal vagy NA-nal kezelve, fokozott monoamin mediált VP, OT felszabadulást mértünk.
- (6) adataink részben korreláltak az irodalmi megállapításokkal, amelyek szorongással vagy agresszióval járó pszichiátriai betegségekben szérumban VP szint emelkedést tapasztaltak. Kísérleteinkben a deponálódott CIB mennyiségek növekedésének függvényében emelkedett az aktív OT és VP mennyisége *in vitro* és *in vivo*. Ezek alapján feltételezhető, hogy a magatartás változásokban az OT/VP hormonok aktuális aránya lehet meghatározó. A D1 és D2 dózisok 30,60 és 90 napos krónikus CIB expozíció hatására az állatok viselkedése megváltozott: fokozódott az anxietás (OF és EPM tesztek) és az agresszió (ERI tesztek).

Az eredmények alapján megállapításainkat és következtetéseinket a célkitűzés kérdésköreinek megfelelően csoportosítottuk.

A CIB vegyületek kémiai jellegük, fiziko-kémiai sajátágaik, ismert biológiai hatásaik (EDC hatások), valamint társadalmi vonatkozásaik (kemizáció, társadalmi tevékenységek, xenobiális jelleg) miatt széles körben elterjedtek. Igazoltuk, hogy a hierarchikus komplexitási szinteket képviselő evolúció minden szintjén jelen vannak, így környezettudományi megközelítés szerint alkalmasak POP/EDC vegyületek expozíciós modelljeként való vizsgálatokra. A CIB vegyületek expozíciós történő alkalmazásakor kombinált kémiai expozíciókat kívántunk vizsgálni. A szakirodalom az expozíciós vizsgálatoknál leginkább csak egy hatásra bekövetkező válaszokat tanulmányoz, ez azonban nem életszerű, hiszen a földi környezetben működő rendszereket (élettelen, élő, társadalom) több expozíciós hatás éri. A legegyszerűbb kombinált expozíciós hatások vizsgálatához indokolt volt kutatás-módszertani vizsgálatok elvégzése, amelynek eredményeként a standardizált kombinált modell-expozítor és vizsgálati modellrendszer kialakítása történt.

Teljesült az alkalmas expozíciós út szerinti a kísérleti rendszer módszertani kutatásokkal standardizált beállítása.

A kombinált, extrém alacsony dózisú, krónikus, táplálkozási útvonalat szimuláló, előzetesen standardizált CIB kezelésekből származó eredményeink új információkkal szolgálnak.

A, Wistar patkányok kezelésekor a gasztrikus szondán át adott extrém alacsony CIB szubtoxikus dózisok (0,1 és 1 µg/tskg/nap) megváltozott szérum OT, VP és ACTH koncentrációt eredményeztek, amely a módosult neuroendokrin szabályozást igazolta.

B, A neuroendokrin szabályozás vizsgálatára alkalmas monoamin (szerotonin, noradrenalin) rendszeren keresztül mediált OT, VP elválasztásban is jelentős változásokat detektáltunk, ami korábbi vizsgálatok alapján nem volt ismert.

C, Az említett stresszhormonok (VP, OT) aktív, szérumbeli koncentrációinak emelkedését az *in vivo* vizsgálatok mellett alkalmazott *in vitro* kutatások is megerősítették.

D, A szerotonin és noradrenalin közvetítette VP és OT elválasztás CIB hatására kialakult fokozódása korrelált a modellvizsgálatokba vont kísérleti állatok viselkedés mintázatainak változásaival, fokozódott a szorongás és agresszió a kezelési dózisok és időtartamok függvényében.

E, A neuroendokrin homeosztatikus szabályozási rendszerben mért eltérések a viselkedés szintjén is detektálhatóvá váltak. A mechanizmus szintű eredményprezentálás során felvetettük annak lehetőségét, hogy az OT és VP aktív hormonformáinak arányával szólhat bele e magatartásformák szabályozásába. Vizsgálati protokollunk ezen feltevés igazolására alkalmas adatokkal szolgált.

F, A környezetben jelen lévő, EDC hatású vegyületek tulajdonságai a CIB-kal összevethetők. Eredményeink alapján ezek jelentős kémiai, biológiai kockázati tényezőként kezelhetők.

- Kémiai kockázatuk xenobiális jellegükből származtatható, amit perzisztenciájuk, reaktív tulajdonságaik, lipofilitásuk, stb. képvisel.
- Biológiai kockázatuk kémiai jellegükből adódóan, továbbá a dózisfüggő hatásokon túl, a homeosztatikus szabályozási rendszerek módosításával hozható összefüggésbe. Ennek eredménye a magatartás, az azonnali alkalmazkodási mintázat megváltozása. Mindezek humán vonatkozásban akár pszichiátriai kórfolyamatok kialakulásának kockázatát fokozhatják.

Kutatási eredményeink szerint a kémiai környezeti terhelésekben, széles körben jelen lévő, modellezett POP/EDC vegyületek, mint expozítorok az élő rendszerek homeosztázisában változásokat generálnak extrém alacsony dózis és krónikus kezelések esetén is. Ennek következményeként a biológiai rendszerek homeosztatisz alkalmazkodási potenciálja módosul, amelyek azonnali alkalmazkodási mintázataikban, a viselkedésben detektálható eltéréseket indukálnak (ami a kognitív folyamatokat, a szociális viselkedési formákat, stb. érinti).

10. Summary

By homeostasis, living organisms maintain equilibrium with their environments, adapt themselves to the changing external and internal circumstances. Any current state of equilibrium can be interpreted as the change of biocommunication processes emerging under the effect of environmental parameters. Living organisms of effective adaptation abilities first show *neurogenic*, then *neuroendocrine*, *neuroendocrine-immune* and the currently known highest level of *psycho-neuroendocrine-immune* communication accommodation. In industry and agricultural, chemicals are widely used compounds. They include such substances carrying particularly significant environmental risks that are called persistent organic pollutants/POP (as they are hard to decompose for their stabile chemical structures) (e.g. dichloro-diphenyl trichloro-ethane /DDT/, hexachlorobenzene /HCB/). A heterogeneous group of POP compounds is constituted by substances disrupting the hormone metabolism and endocrine communication, and is known as endocrine disruptor (EDC) compounds. Studies on the impacts of EDC compounds on behaviour have shed light on information relating to sexual behaviour, emotional tone, motivation, communication, anxiety, aggression, dominance and forms of social behaviour. EDC compounds may activate or inhibit the endocrine system, thus the synthesis of hormones, their storage, release, transport and metabolism, as well as the receptor recognition and binding, and furthermore they may interfere in neuroendocrine processes affecting induced responses.

In the central nervous system, the structures in charge of endocrine responses and behavioural functions are common, and therefore hormones often exercise a direct impact on behaviour (and vice versa), or alternatively they may indirectly influence it via the modification of metabolism.

(1) In the course of our work, from among EDC compounds and the group of aromatic halogenated hydrocarbons *ClB has been chosen as a model compound to use this represented group of compounds for calling the attention to the threat that may be conveyed by the modification of homeostatic systems*. ClB compounds have already been forbidden in agriculture, though in certain developing countries they are still used. Their application in industry is regulated by means of exposure thresholds (statutory limits). ClB's most stabile lipophylic representative is HCB. From this xenobiotic group, there are derivatives of lower chlorine substitution and lipophylic properties present in our environment, while their chemical reactivity is higher than that of HCB.

(2) Living organisms are normally subject to several exposure harms, i.e. stress (effects) simultaneously, and therefore *we have also set the objective to develop and standardize a*

research protocol that is suitable for the examination of effects triggered by combined chemical loadings. In our researches, we have tried to work out and standardize the examination model system for the combined effects of two chlorobenzene derivatives, HCB and TCB.

(3) In our studies, we endeavoured *to develop an in vivo treatment protocol for modelling chemical exposure*, in order to acquire data suitable for evaluating the preservation of the environmental adaptive potential maintained through accommodation.

(4) Our primary objective was to *evaluate the effects of combined ClB exposure on the neuroendocrine homeostatic control system* by studying the accommodative regulation mediated by the stress hormones OT, AVP, and ACTH.

(5) We endeavoured to *create an in vitro model for exploring stress hormone release inducible by the effects of combined exposure*, which would be suitable also for the standardized monitoring of releasing processes.

(6) In view of the legal regulations pertaining to the limit on ClB exposure, we considered *ascertaining whether extremely low-dose combined ClB load induces changes in the neuroendocrine control of stress hormones* an important assignment.

(7) Behavioural patterns are mostly determined by the biogenic amines driving the communication between hormones and cells participating in neuroendocrine regulation. We have examined how the ClB exposure *can modify the OT, VP release mediated by the biogenic amines (5-HT, NA)*.

(8) We intended to ascertain, *whether the stress responses mediated by hormones and biogenic amines alter the rapid adaptation pattern – that is, animal behaviour*.

(9) Our objectives also included answering the question *whether any combined chlorobenzene treatment of much smaller dosage than the exposure dosage permitted in the relevant legal regulations causes measurable changes in the behaviour of test animals*.

(10) The analysis of our findings focused on identifying the homeostatic mechanisms potentially related to the changes detected in behavioural patterns and/or neuroendocrine regulation by the research protocols outlined above.

(11) Furthermore, we wanted to appraise any additional health risk potentially represented by EDCs, in view of the findings obtained with ClB as their model substance.

(12) Finally, by analyzing our results, we wanted to decide whether the amended regulations should apply to all EDC compounds characterized by or devoid of accumulation.

On the basis of our results:

- (1) Starting on Day 60, the serum level of AVP increased progressively with both (D1 and D2) doses, and the difference vs. control reached statistical significance after 90 days of exposure.
- (2) Compared to controls, the increase of serum OT level was statistically significant as early as after 60 days of exposure.
- (3) Serum ACTH level increased after both doses. However, while the increase induced by the larger dose became significant after 30 days of exposure, the smaller dose achieved the same only after 90 days of exposure.
- (4) In neurophyseal in cell cultures, the *in vitro* secretion of VP and OT increased in a time-dependent fashion after both (D1 and D2) D1 doses of ClB.
- (5) Both 5-HT and NA significantly increased the release of VP and OT by neurohypophyseal cell cultures. Specifically, we found enhanced monoamine-mediated VP and OT release following the treatment of standardized cell cultures prepared from NH monolayer controls and ClB pre-treated systems with 10^{-6} M 5-HT or NA.
- (6) Our findings are in partial agreement with observations published in the literature, which include elevated serum VP level found in psychiatric disorders associated with anxiety or aggression. In our experiments, the quantity of active OT and VP increased depending on the extent of ClB accumulation – both *in vitro* and *in vivo*. This suggests that the actual ratio of OT and VP hormones might play a decisive role in behavioural changes. Chronic exposure to ClB administered at two dose levels (D1 and D2) for 30, 60, and 90 days altered the behaviour of the animals – that is, increased both anxiety (as shown by OF and EPM tests) and aggression (as demonstrated by ERI tests).

Based on the findings, we grouped our results and conclusions around the topics defined in the objectives of this research.

Owing to their chemical nature, physical-chemical properties, known biological actions (EDC effects), and social implications (chemicalization, social activities, xenobiotic character) ClB compounds are ubiquitous substances. We demonstrated their presence in all levels of evolution representing a hierarchy of complexity. Therefore, according to the approach of environmental science, they are suitable for use in model studies of POP/EDC exposure. We intended to investigate multiple chemical exposures by selecting ClB compounds as the exposure agents. Although most exposure studies published in the literature evaluate

responses to a single effect only, this is unrealistic, as all systems on Earth (inanimate objects, living organisms, and the society) are subject to multiple exposures simultaneously. The research methodology studies required before investigating the effects of even the simplest forms of combined exposure led to the development of standardized models for evaluating the impact of exposure to several factors. Methodology studies have thus accomplished the standardization of the experimental system by suitable exposure routes.

Our results with combined, extremely low-dose, long-term, pre-standardized CLB treatment simulating gastrointestinal exposure contribute novel information.

A. In Wistar rats, treatment with CLB administered through a gastric tube in extremely low, subtoxic doses (0.1 and 1 µg/kg body weight/day) was associated with changes in the serum levels of OT, VP, and ACTH – this confirmed the alteration of neuroendocrine regulation.

B. Additionally, we detected substantial changes in OT and VP release mediated by the monoamine (serotonin and norepinephrine) system suitable for the investigation of neuroendocrine regulation – such changes have not yet been reported from earlier studies.

C. In addition to performing in vivo studies, we confirmed the elevation of the serum level of the active fraction of the stress hormones in question (i.e. VP and OT) also by conducting in vitro experiments.

D. The CLB-induced enhancement of serotonin- and norepinephrine-mediated VP and OT release correlated with changes in the behavioural patterns of the laboratory animals used in the experimental models. Specifically, we observed a dose-related and time-dependent increase of anxiety and aggression.

E. The abnormalities detected in the neuroendocrine homeostatic control system manifested as behavioural changes. Presenting the results at the mechanistic level, we have suggested that the ratio of the active forms of OT and VP may have a role in the control of these behaviours. The protocol of our study has contributed data appropriate for confirming this suggestion.

F. The properties of EDCs present in the environment are comparable to those of CLBs. As shown by our results, these may be regarded as significant chemical and biological risk factors.

- These substances represent a chemical risk owing to their xenobiotic nature, represented by persistence, reactive and lipophilic properties, etc.
- They represent a biological risk in addition, owing to their chemical properties, as well as because of their dose-dependent effect, and influence on homeostatic regulatory systems. Aggregately, these result in the changes of behavioural and rapid

adaptation patterns. Eventually, this might even increase the risk of psychiatric disease as far as human effects are concerned.

According to our findings obtained in an experimental model, the actions of POPs and EDCs – ubiquitous in the environment as components of the chemical load – as exposure agents generate changes in the homeostasis of biological systems even in extremely low doses, when acting on the long term. In biological systems, these lead to alterations in the potential for homeostatic adaptation, which in turn induce changes in rapid adaptation patterns and behaviour (involving cognitive processes and social behaviour, etc.).

In view of our results, reviewing current legal regulations on the use of the POPs/EDCs studied seems justified.