

Ph.D. értekezés tézisei

**KÖRNYEZETTERHELŐ HALOGÉNEZETT SZÉNHIDROGÉNEK
HATÁSA NEUROENDOKRIN SZABÁLYOZÁSSAL
KÖZVETÍTETT ALKALMAZKODÁSBAN**

Dr. Valkusz Zsuzsanna

Témavezető: Dr. Gálfi Márta, habilitált főiskolai tanár

Környezettudományi Doktori iskola

Szegedi Tudományegyetem, Környezettudományi Intézet
Környezet-biológia és Környezeti Nevelés Tanszék

2011

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-Triklor-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

Bevezetés

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. Ezek között található olyan különösen jelentős környezeti kockázatot képviselő anyagok, amelyeket perzisztens (stabil kémiai szerkezetük miatt nehezen bomló) szerves szennyező – POP/Persistent Organic Pollutant – vegyületeknek nevezünk (pl. diklór-difenil-triklór-etán /DDT/, hexaklórbenzol /HCB). A POP vegyületek heterogén csoportja a hormonháztartást, az endokrin kommunikációt zavaró anyagok, amelyeket 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 közesek, így a hormonok gyakran direkt hatással lehetnek a viselkedésre (és fordítva), vagy a metabolizmus módosításán keresztül indirekt módon is befolyásolhatják azt.

Célkitűzések

(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-k 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 homeosztatisz szabályozási rendszerre kifejített 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 „release” folyamatok standardizált követése is megvalósítható.*

(6) *Különösen érdekes kérdésnek tekintettük, a CIB 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 CIB 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 homeosztatisz mechanizmusokkal hozhatók összefüggésbe.*

(11) *Választ kerestünk arra is, hogy a CIB 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.*

Módszerek

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 (ketreceként 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.

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 vált standardizálhatóvá a vizsgálat. 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), amelyeket az irodalom szerint 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).

Kísérleti protokoll: Az állatokat a 3.3 fejezetben ismertetett csoportoséma 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-oxalacetát-transzamináz (SGOT), szérum glutamát-piruvát-transzamináz (SGPT) és gamma-glutamil-transzpeptidáz (GGT) – határoztunk meg, amelyek a klórbenzol expozíciók toxicitásának igazolt markerei. 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) sejt kultúrákat készítettünk. A megfelelő korú in vitro monolayer kultúrák ACTH, VP, OT kiválasztás 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.

Viselkedés vizsgálatok: A kísérletek során minden állatot egyszer használtunk az egyes viselkedés-tesztekben. A teszteket azonos körülmények mellett, 1 órás, a helyiséghez való habituációt követően indítottuk el. Az állatokat protokoll szerinti csoportbeosztásban, de véletlenszerű sorrendben vontuk be a vizsgálatokba. A mutatott viselkedési elemeket a teszttartáson felett, a mennyezetre erősített kamerával, illetve egy hozzá kapcsolt viselkedési szoftver: az Ethovision (v2.3, Noldus Information Technology, Wageningen, Hollandia) segítségével rögzítettük.

Open field (OF) teszt: Az OF teszt egy standardizált módszer a rágcsálókra jellemző lokomotoros aktivitás, felfedező viselkedés, kíváncsiság, szorongás és habituálódás vizsgálatára.

Elevated plus maze (EPM) teszt: Az EPM teszt a rágcsálók szorongásának vizsgálatára alkalmas standard eljárás. A vizsgálat során a megfigyelésre kerültek 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.

Hímek közötti agresszivitás vizsgálata (RI teszt): Kísérleti protokollunkban az állatok agressziójának vizsgálatához módosított RI tesztet végeztük. A resident (bentlakó) állatot forgáccsal borított arénába helyeztük, majd 5 percig hagytuk habituálódni. A teszt ideje alatt rögzítettük a resident-re jellemző lokomotoros/exploratív és a szorongásra utaló viselkedéselemeket. Az intruder (betolakodó) állatot a habituációt követően, a kísérlet 6. percében helyeztük a resident mellé. Az állatok viselkedését 5 percig vizsgáltuk.

Neurohipofízis (NH) monolayer sejt kultúrák: A különféle kezelési sémákba bevont állatokból preparáló mikroszkóp alatt, steril körülmények között eltávolítottuk a hipofízist, majd szeparáltuk a NH. A NH-ből a hártvány eltávolítása után történt a pituicyták szeparálása enzimatis / (30 perc, trypsin [0,2 %] és 60 perc, kollagenáz [50 µg/ml] és 60 perc, dispáz [50 µg/ml] és 30 perc, DN-áz [30 µg/ml]), majd mechanikus (nejlon-blutex filter 80 µm Ø) úton. A sejtsuszpenziót DMEM + 20% FCS + 30U/ml Pen-Strep tápoldatba helyeztük, és meghatároztuk a sejtek viabilitását Trypan-blue teszttel ($\geq 95\%$). Ezután a sejtsuszpenzió koncentrációját 2×10^5 sejt/ml-re állítottuk be. A szuszpendált sejteket 5 % kollagénnel felületkezelt plastik tenyésztőedényekbe helyeztük. A sejt kultúrákat 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.

Adenohipofízis (AdH) monolayer sejt kultúrák: A különféle kezelési sémákba bevont Wistar patkányokból preparáló mikroszkóp alatt, steril körülmények mellett eltávolítottuk a hipofízist, majd az AdH-t. Az AdH-ről a hártályakat eltávolítottuk, majd diszpergáltuk a sejteket enzimátikus (30 perc, trypsin [0,2 %] és 40 perc, kollagenáz [50 µg/ml] és 40 perc, dispáz [50 µg/ml] és 20 perc, DN-áz [30 µg/ml]), majd mechanikus (nejlon-blutex filter 83 µm Ø) disszociáltatással. A kapott sejt szuszpenziót DMEM + 10% FCS + 10U/ml Pen-Strep tápoldatba helyeztük. Miután meghatároztuk a sejtek viabilitását Trypan-blue teszttel ($\geq 95\%$), a sejt szuszpenzió 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.

In vitro „release” vizsgálatok: A monolayer AdH és NH sejt kultúrák felülúszó médiumait FCS mentes fiziológiás 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 plasztik csövekbe, amelyeket azonnal -70 °C-ra tettünk. Az összegyűjtött mintákból RIA módszerekkel AdH kultúrákból

ACTH-t, NH kultúrákból OT, VP hormonokat határoztunk meg. Az alap hormon szekréció kinetika felvétele után, a tenyészeteket ismét mostuk, majd 12 órán át fiziológiás körülmények között tartottuk. Ezután 30mM Kálium indukcióval aspecifikus felszabadulási kinetikát határoztunk meg, 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.

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, amelyeket RIA módszerrel való méréséig $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ -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 sejt kultúrák kondicionált médiumait begyűjtöttük, $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on lefagyasztottuk, majd a későbbiekben RIA módszerrel meghatároztuk a szekretált VP és OT koncentrációkat.

AVP, OT és ACTH meghatározás felülúszó médiumból: A NH sejt kultúrák felülúszó médiumaiból a VP/OT szintek meghatározásához alkalmazott protokollokat irodalom szerint használtuk. A médiumok a mintavételt megelőzően, a sejt kultúrák kezelési sémái szerint voltak kondicionálva. A sejt kultúrákról a felülúszót eltávolítottuk, majd a mérés kezdetéig $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. A mintákból módosított RIA módszerrel történt a VP vagy OT 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 határoztuk meg. Eredményeinket mg fehérjetartalomra vonatkoztatva adtuk

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

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 szérum VP/OT/ACTH szintek RIA és LIA meghatározását a korábban már említett módszerekkel végeztük.

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 elemeztük.

Eredmények összefoglalása:

- (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 szérum OT már a 60 napos expozíció esetén szignifikánsan emelkedett a kontroll állatokban mért értékekhez képest.
- (3) a szérum 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 szekréciót *in vitro* sejt kultúrákon vizsgálva az alkalmazott D1 D2 dózisú klórbenzol kezeléseknél időfüggően fokozódott a hormonelválasztás.

- (5) az 5-HT és a NA szignifikáns mértékben fokozta *in vitro* a neurohipofízis sejt kultúrák 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 dózisos 30,60 és 90 napos krónikus CIB expozíció hatására az állatok viselkedése megváltozott: fokozódott az anxiétás (OF és EPM tesztek) és az agresszió (ERI tesztek) /1-2/.

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

A CIB vegyületek kémiai jellegük, fiziko-kémiai sajátosságai, ismert biológiai hatásai (EDC hatások), valamint társadalmi vonatkozásaik (kemizáció, társadalmi tevékenységek, xenobiális jelleg) miatt széles körben elterjedtek /6-9/. 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 modelljeként történő alkalmazásakor kombinált kémiai expozíciókat kívántunk vizsgálni. A szakirodalom az expozíciós vizsgálatoknál leginkább csak egy hatásra bekövetkező válaszokat tanulmányoz, ez azonban nem eletszerű, 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 /5/. 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/3-4/.

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 homeosztatisz 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 kockázatok xenobiális jellegükből származtatható, amit perzisztenciájuk, reaktív tulajdonságaik, lipofilitásuk, stb. képvisel.
- Biológiai kockázatok kémiai jellegükből adódóan, továbbá a dózisfüggő hatásokon túl, a homeosztatisz 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).

Eredményeink alapján a vizsgált POP/EDC vegyületek alkalmazását illető jogi szabályozások átgondolása indokolt.

Az értekezés témájában megjelent közlemények absztraktok nélkül

1. **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 Mar 16.
2. G. Nagyeri, **Z. Valkusz**, M. Radacs^b, 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 pub)+.
3. 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).
4. 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).
5. 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).
6. **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).
7. 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).
 8. 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).
 9. **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)