

Pécsi Tudományegyetem Egészségtudományi Kar

Egészségtudományi Doktori Iskola

Pécs

Doktori Iskola vezetője: PROF. DR. BÓDIS JÓZSEF egyetemi tanár

**Fogamzásgátló hatóanyag-maradványok által kiváltott
szomatikus és molekuláris változások gerinctelen és gerinces
vízi tesztállatokon**

Doktori (PhD) értekezés

ZRÍNYI ZITA

Témavezető:

DR. PIRGER ZSOLT tudományos főmunkatárs
MTA ÖK BLI, Tihany

Onkológia-egészségtudomány (P-6) doktori program

Programvezető:

PROF. DR. KISS ISTVÁN egyetemi tanár

Diagnosztikai Képzésközpont (PR-6/2) alprogram

Alprogramvezető:

PROF. DR. BOGNER PÉTER egyetemi tanár

Pécs, 2017

Tartalom

Az értekezésben használt rövidítések jegyzéke	4
1 Bevezetés	6
2 Irodalmi áttekintés	7
2.1 Fogamzásgátló hatóanyagok típusai.....	7
2.2 Fogamzásgátló hatóanyagok előfordulása a természetes vizekben.....	11
2.3 Fogamzásgátló hatóanyagok hatásai gerinctelen és gerinces vízi állatokban 12	
2.4 A kísérleti állatok bemutatása	18
3 Célkitűzés.....	25
4 Anyagok és módszerek	26
4.1 Kísérleti állatok	26
4.1.1 Nagy mocsári csiga	26
4.1.2 Bodorka	26
4.2 Kémiai anyagok és kezelés.....	27
4.2.1 A nagy mocsári csiga progesztogén kezelése	27
4.2.2 A bodorka progesztogén kezelése.....	28
4.3 A petezsákok minőség értékelő rendszere.....	29
4.4 Az embrionális fejlődés korai szakaszának vizsgálata.....	30
4.5 Vitellogenin ELISA.....	30
4.6 DJ-1 ELISA	31
4.7 Immunhisztokémia	32
4.7.1 GnRH-szerű fehérjék vizualizálása.....	32
4.7.2 DJ-1 szerű fehérje vizualizálása.....	32
4.8 Áramlási citometria	33
4.9 Kapilláris mikromintavételi technika	34
4.10 Tömegspektrometria.....	35
4.10.1 Off-line NanoElectrospray IMS TOF tömegspektrométer	35
4.10.2 Off-line NanoElectrospray ion csapda tömegspektrométer	35
4.11 Adatemelezés	36
4.12 Szérum koleszterin, LDL-, HDL-koleszterin és triglicerid mérés	37
4.13 Stressz fehérjék vizsgálata.....	37
4.14 Statisztikai analízis	38
5 Eredmények	39
5.1 Progesztogének hatása a nagy mocsári csigában.....	39
5.1.1 Kvantitatív molekuláris változások.....	39
5.1.2 A hím reprodukciós rendszerben megfigyelt hatások.....	40

5.1.3	A nőstény reprodukciós rendszerben megfigyelt hatások.....	45
5.1.4	A szülők progesztogén kezelésének utódokra kifejtett hatása	48
5.2	Progesztogének hatása a bodorkában	56
5.2.1	Morfológiai változások	56
5.2.2	Molekuláris változások	57
6	Megbeszélés és következtetések	63
6.1	Progesztogének hatása a nagy mocsári csiga reprodukciójára és embrionális fejlődésére	63
6.2	Progesztogének okozta fiziológiai és molekuláris változások bodorkában	71
7	Összefoglalás	76
8	Új tudományos eredmények	79
9	Mellékletek	80
10	Ábrák és táblázatok jegyzéke.....	94
10.1	Ábrák jegyzéke.....	94
10.2	Táblázatok jegyzéke	95
11	Az értekezés alapjául szolgáló tudományos közlemények és előadások	95
11.1	Közlemények.....	95
11.1.1	Az értekezés alapjául szolgáló tudományos közlemények idegen nyelven	95
11.1.2	Az értekezés alapjául szolgáló tudományos közlemények magyar nyelven	95
11.2	Előadások	96
11.2.1	Az értekezés alapjául szolgáló tudományos előadások idegen nyelven	96
11.2.2	Az értekezés alapjául szolgáló tudományos előadások magyar nyelven	96
12	Az értekezés témáján kívüli közlemények, előadások és absztraktok	97
12.1	Közlemények.....	97
12.1.1	Az értekezés témáján kívüli közlemények idegen nyelven.....	97
12.1.2	Az értekezés témáján kívüli közlemények magyar nyelven	98
12.2	Előadások	98
12.2.1	Az értekezés témáján kívüli előadások idegen nyelven.....	98
12.2.2	Az értekezés témáján kívüli előadások magyar nyelven.....	99
12.3	Összefoglaló tudományometriai táblázat az MTMT adatbázis alapján	100
13	Köszönetnyilvánítás	102
14	Irodalomjegyzék.....	103

Az értekezésben használt rövidítések jegyzéke

ADP – adenozin-difoszfát
AMP – adenozin-monofoszfát
APGWamid –amidált alanin-glicin-prolin-triptofán tetrapeptid
AR – androgén receptor
ASI – agyi szomatikus index
ATP – adenozin-trioszfát
CCS – ütközési keresztmetszet (Collision Cross Section)
CDC – kaudo-dorzális sejt (CaudoDorsal Cell)
CDCH – CDC által termelt hormon
CDP – citidin-difoszfát
CID – ütközési gáz segített fragmentáció (Collison Induced Decay)
CMP – citidin-monofoszfát
CNS – központi idegrendszer (Central Nervous System)
CPA – ciproteron-acetát
CTP – citidin-trifoszfát
DBH – dorzális-test hormon (Dorsal Body Hormone)
DJ-1 – protein deglikáz
DPBS – Dulbecco-által módosított foszfát puffer + sók komplex oldata
DRO – drospirenon
E2 – 17 β -ösztradiol
ED – endokrin diszruptor
EE2 – 17 α -etinilösztradiol
ELISA – enzimmel kapcsolt immunszorbens teszt (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay)
ER – ösztrogén receptor
FLRFamid – amidált tetrapeptid
FMRFamid – amidált tetrapeptid
FSH – tüsző stimuláló hormon
FWHM – fél-érték szélesség (Full Width at Half Maximum)
GDP – guanozin-difoszfát
GES – gesztodén
GMP – guanozin-monofoszfát
GnRH – gonadotropin felszabadító hormon
GPCR – G-protein kapcsolt receptor
GR - glükokortikoid receptor
GSH – glutation, tripeptid (redukált forma)
GSH+Na – glutation nátrium addukt
GSI – gonadoszomatikus index
GSSG –glutation-diszulfid (oxidált forma)
GTP – guanozin-trifoszfát
HDL-koleszterin – magas sűrűségű lipoprotein koleszterin (High Density Lipoprotein)
HPG tengely – hipotalamusz-hipofízis-gonád tengely
HRP – torma peroxidáz (HorseRadish Peroxidase)

IHC – immunhisztokémia (ImmunoHistoChemistry)
 IMP – inozin-monofoszfát
 IMS – ion mobilitás elválasztás (Ion Mobility Separation)
 IMS-TOF MS – ion mobilitás analízátorral és repülési idő analízátorral szerelt tömegspektrométer (Ion Mobility Separation-Time-Of-Flight Mass Spectrometer)
 L/RBG – bal/jobb pofadúc (bukkális ganglion)
 L/RCG – bal/jobb agydúc (cerebrális ganglion)
 L/RPeG – bal/jobb lábdúc (pedális ganglion)
 L/RPG – bal/jobb fali dúc (parietális ganglion)
 L/RPIG – bal/jobb köpenydúc (pleurális ganglion)
 LDL-koleszterin – alacsony sűrűségű lipoprotein koleszterin (Low Density Lipoprotein)
 LH – sárgatest serkentő (luteinizáló) hormon
 LIP – *Lymnaea*-eredetű gátló fehérje (*Lymnaea* Inhibitor Peptide)
 LNG – levonorgesztrel
 m/z – tömeg/töltés arány (mass to charge ratio)
 mPR – membrán progeszteron receptor
 MR – mineralokortikoid receptor
 MSI – máj szomatikus index
 NAD – nikotinamid-adenin-dinukleotid (oxidált forma)
 NADH – nikotinamid-adenin-dinukleotid (redukált forma)
 nPR – mag progeszteron receptor
 NRF2 – nukleáris faktor eritroid 2 – kapcsolt faktor 2
 OECD – Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet
 P5 – pregnenolon
 PB – foszfát puffer
 PBS – foszfát puffer + sók oldata (Phosphate Buffered Saline)
 PFA - paraformaldehid
 PR – progeszteron receptor
 PRG – progeszteron
 PSF – polipirimidin traktus-kötő fehérje asszociált kivágást irányító faktor (PTB-associated Splicing Factor)
 RPeN – N-típusú motoros sejtcsoport a jobb lábdúcban
 TBT – tributiltin (xenoösztrógen)
 TRITC – tetrametilrodamin izotiocianát származéka
 UDP – uridin-difoszfát
 UDP HexNAc – uridin-difoszfát N-acetil-hexózamin
 UMP – uridin-monofoszfát
 UTP – uridin-trifoszfát
 VG – zsigerdúc (viscerális ganglion)
 VSI – vese szomatikus index
 VTG – vitellogenin
 VZ – vinclozolin
 WWTP – szennyvíztisztító telepek (WasteWater Treatment Plant)

1 Bevezetés

Jelenleg, becslések szerint a fogamzó képes korban lévő nők 30%-a használ világszerte hormon tartalmú születés-szabályozó szert tablettá, injekció, intrauterin eszköz, stb. formájában [1,2]. Az orális fogamzásgátlók ösztrogén és/vagy progesztogén hatóanyagot tartalmaznak, de a gyógyászatban (pl. hormon pótlás) is használják ezeket a szereket. A széleskörű felhasználásból és az alacsony biohasznosulásból adódóan ezek biológiailag aktív formában (anyavegyületek és metabolitjaik) kerülnek a szennyvízhálózatba és érik el a szennyvíztisztító telepeket (WWTP), ahol az általánosan használt tisztítási eljárások az ösztrogén szennyezést nagymértékben kiszűrik, de nem alkalmasak a progesztogén szennyezés megszüntetésére [3,4]. Az emberi felhasználásból eredő szennyezés mellett számottevő az ipari eredetű (pl. papírgyárak) és az állattartó telepek elfolyóinak környezetbe bocsátott progesztogén tartalma is [5,6]. Az elmúlt években ezek a gyógyszermaradványok világszerte az egyik legjobban tanulmányozott szteroid típusú környezetszennyező molekulákká váltak. Richardson és Bowron [7] publikálta az első olyan összefoglaló tanulmányt, ami ng/L koncentrációtartományban említi az ösztrogén és a progesztogén típusú vegyületek eredeti formájának jelenlétét, mint ED-okat a természetes vizekben. Az analitikai technikák fejlődésével a detektálhatósági szint csökkenésének eredményeként emelkedett a mérhető szex-szteroidok száma [2,8]. Jelenlétükről a szennyvízben és a felszíni vizekben, amelyek ökotoxikológiai szempontból mérvadók, néhány ng/L koncentrációtartománytól gyakran több száz ng/L koncentrációtartományig (ösztrogének: 0,2-180 ng/L, progesztogének: 0,07-22,2 ng/L) publikáltak eredményeket világszerte [2,9,10].

Tekintettel arra, hogy ezek a hormonok szabályozzák az emberi szervezetben a menstruációs ciklust, a terhességet és az embriogenezist, a vízi környezetbe kerülve a nem-célszervezeteknek tekintett organizmusok reprodukciójára is hatással vannak [6,9,11,12]. Az elmúlt években publikált ED kutatások többsége az ösztrogén típusú (pl. 17α -etinilösztradiol, 17β -ösztradiol és ösztroon) szennyezés hatásait vizsgálta [2]. Ezek a hatóanyagok már 1 ng/L koncentrációban káros hatást fejtenek ki például a halakon, mind morfológiai (pl. ikra, máj, vese), mind molekuláris szinteken (pl. vitellogenin) [8,13,14,15]

Viszonylag kevés irodalmi adat áll azonban rendelkezésre a progesztogének nem-célszervezeteken kifejtett kedvezőtlen élettani hatásairól, pedig azok bioakkumulációja mind gerinctelen (pl. zebra kagyló, *Dreissena polymorpha*), mind gerinces (pl. szivárványos pisztráng, *Oncorhynchus mykiss*) édesvízi fajokban ismert [3,16,17]. Ezekben a vízi szervezetekben a progesztogének neuroszteroidként fontos szerepet játszanak az agyi folyamatokban is [18], valamint hatással vannak az állatok saját hormon szintjére, zavarják az endokrin rendszer működését, negatívan hatnak a fejlődésre, az ivarsejtekérésére és megváltoztatják a párzási viselkedést, vagy a másodlagos nemi jellegek kifejlődését [6].

Habár az egyes progesztogének környezeti koncentrációja általában alacsony, több ilyen gyógyszermaradvány egyidejű jelenléte, még kis koncentrációban is elég ahhoz, hogy ED-ként változást okozzon a vízi életközösségek egyedeiben. Ezért egy többféle hormonokból álló keveréket alkalmazó kísérleti elrendezés valós környezeti kockázat-becslésre ad lehetőséget. Ilyen jellegű kísérleteket ösztrogének és/vagy progesztogének egyidejű alkalmazásával, kétkomponensű expozícióval közöltek már korábban [8,12,19]. Azonban csak progesztogénekből álló, három és négy komponensű hormon keverékkel történő kísérletet (PRG, LNG, GES, DRO), környezeti expozíciót modellezve, gerinctelen vagy gerinces tesztállaton ez idáig nem végeztek.

2 Irodalmi áttekintés

2.1 Fogamzásgátló hatóanyagok típusai

A női fogamzásgátló tabletták ösztrogén és/vagy progesztogén típusú hormonális hatóanyagot tartalmazhatnak. Attól függően, hogy az egyes tablettákban milyen a két komponens aránya, megkülönböztetünk egy-, két- és háromfázisú készítményeket. Léteznek azonban ún. minipill tabletták, amelyek csak progesztogén összetevőt tartalmaznak és alkalmazható fogamzásgátlásra hormon injekció, vagy intrauterin hormont kibocsátó eszköz, melyek szintén progesztogén tartalmúak. A fogamzásgátló tabletták ma használatos típusai a hatóanyagok folyamatos fejlesztésével több évtized alatt alakultak ki, amellyel elérték a megfelelő hatékonyságot és szelektivitást, valamint felhasználóbarát terméket sikerült előállítani. Az Egyesült Államokban 1960-ban jelent meg először hormontartalmú fogamzásgátló tabletta Enovid néven (9,85 mg noretinodrel/0,15 mg mestranol) [20]. Európában

Németországban került először gyógyszerári forgalomba orális fogamzásgátló 1961-ben, Anovlar néven (4 mg 17α -etinil-19-nortesztozteron-acetát/0,05 mg etinilösztadiol). Magyarországon 1967-ben forgalmaztak először szájon át szedhető hormonális fogamzásgátlót [21]. Az Infecundin néven ekkor forgalomba helyezett tablettát Richter Gedeon és Ludwig Haberlandt az 1930-as évek végén alkották meg, de a hazai közvélekedés (morális és etikai gátlás) és politikai élet (Ratkó-korszak, 1956-os abortusz törvény), valamint külföldi események (Anschluss, 1938) miatt a végső kivitelezés 1967-ig váratott magára.

Az ösztrogén összetevő tekintetében már az első generációs tabletták között megjelent és később kizárólagosan alkalmazott hatóanyag lett az etinil-ösztadiol. Az egyes generációk közti különbség az ösztrogén komponens szempontjából csak annak tablettánkénti mennyisége, amelyet folyamatosan csökkentettek. Az első generációs szerekben alkalmazott mennyiséghez képest (50-150 μ g) a harmadik generációs szerekben már csak 20 μ g etinil-ösztadiolt alkalmaztak [22,23].

A fogamzásgátló tabletták másik komponensei, a progesztogének, olyan hatóanyagok, melyek a PRG-hoz hasonló módon hatnak, de a PR-hoz specifikusabban kötődnek (emiat mellékhatásaik is eltérnek a PRG-étól). Ez tette lehetővé a hatóanyag tablettánkénti csökkentését a gyógyszergyártás fejlődésével. Mivel a természetes PRG a szervezetben gyorsan inaktiválódik, ezért a fogamzásgátló tablettákhoz szintetikus PRG származékok, ún. progesztinek kifejlesztésére volt szükség. Ezek a következő osztályokba sorolhatók: 17α -hidroxiprogeszteron- (pregnánok); 17α -norhidroxiprogeszteron- és 19-norprogeszteron- (norpregnánok), illetve 19-nortesztozteron-származékok (ösztánok és gonánok) [9,24]. Ellentétben az ösztrogénekkel, a progesztogén összetevő tekintetében jelentős különbség van az egyes generációk között, mind a hatóanyag típusát, mind a mennyiségét tekintve. A kutatások mozgató irányelve a potensebb, szelektívebb hatású progesztogén hatóanyag kifejlesztése volt, csökkentve a dózist és az androgén mellékhatásokat. Az első generációs tablettákban nagy dózisban alkalmazott noretinodrel után a második generációs tabletták (1970-es évek) már jóval kisebb adagokban tartalmaztak LNG-t (tesztozteron származék, 50-150 μ g), vagy noretiszteront (tesztozteron származék, 1 mg). A harmadik generációs tabletták (1980-as évek) norgesztimát (19-nortesztozteron származék, 250 μ g), desogestrel (19-nortesztozteron származék, 150 μ g), GES (19-nortesztozteron származék, 75 μ g) vagy CPA (17-hidroxiprogeszteron származék, 2 mg) tartalmúak [25]. A negyedik generációs tabletták hatóanyagai DRO

(spironolakton származék, 3 mg), dienogest (19-nortesztozteron származék, 2-3 mg), vagy nomegestrol acetát (norpregnán - progeszteron származék, 2,5 mg) lehetnek [26,27]. Az első és második generációs progesztogének mellékhatásai közül a dolgozatban később bemutatott eredmények szempontjából fontos megemlítenünk a kedvezőtlen hatást a lipidanyagcserére (LDL-koleszterin emelkedés, HDL-koleszterin csökkenés) és szénhidrát metabolizmusra, továbbá súlygyarapodást okozhatnak, attól függően, hogy mennyire erős a progesztogén androgén mellékhatása. Ezeket a mellékhatásokat a harmadik és negyedik generációs tablettáknál egyre csökkentették, illetve a negyedik generációs DRO esetén már nem tapasztalhatók ilyen problémák [28,29].

Hatásmechanizmus

Napjainkban hozzávetőleg 20 különböző progesztogén hatóanyag van forgalomban a humán- és az állatgyógyászatban, amelyek fiziológiai hatásait a GPCR családba tartozó PR-ok (mag és membrán receptorok) közvetítik a mag felé [24]. A progesztogének fő feladata, hogy a hipofízis GnRH termelését monotonná tegyék, így elmaradnak a ciklus változásai, a GnRH csúcsot is beleértve, ezért a petefészekben nem fejlődik ki Graaf-tüsző, valamint nem változik az endometrium, hanem a korai proliferációs szakasz képét mutatja [30]. Ha nem fejlődik ki Graaf-tüsző és abból nem lökődik ki érett petesejt, akkor nem alakul ki sárgatest, ami a sárgatest hormont, azaz a PRG-t termelné, amely az egyetlen természetes szteránvázas progesztogén hormon [31,32,33]. Részben a sejtmag PR-on keresztül hat és módosítja az adott gének transzkripcióját [31]. Ennek eredményeként, fő élettani hatásai:

- a méh felkészítése a terhességre, majd a terhesség fenntartása, a blasztociszta beágyazódásában betöltött szerep
- az agyalapi mirigy GnRH termelésének gátlása, ezáltal a gaméta termelés szabályozása
- az ösztrogén-szulfotranszferáz (ösztrogének lebontása) és a 17-hidroxiszteroid dehidrogenáz (androsztendion-tesztoszteron, ösztradiol-ösztroon átalakulás katalizálása) enzimek indukciója (anti-ösztrogén hatások).

A PRG-nak vannak azonban gyorsabb, metabolikus hatásai is. Ezek egyéb receptorokkal (GABA, NMDA, és acetil-kolin) történő kölcsönhatás útján valósulnak meg. Ilyen hatások pl. a petesejt érésében betöltött szerep, a reprodukív jelátvitel módosítása az agyban, a nyugtató hatás, a glükóz metabolizmusra gyakorolt (káros)

hatás [32]. Mind a progesztogének, mind a metabolitjaik affinitást mutatnak egyéb szteroid hormon receptorokkal (pl. AR, ER, GR vagy MR) szemben is [6,11,12,31]. Ezáltal a progesztogén hatás mellett, (anti-) androgén, (anti-) ösztrogén, glükokortikoid és anti-mineralokortikoid hatást is képesek kifejteni [34] (**1. táblázat**). A mesterséges progesztogének a természetes PRG-nál potensebb szerek, pl. jobban gátolják az agyalapi mirigy FSH és LH termelését. Metabolikus hatásuk kémiai szerkezetüktől függ, így pl. az etinilált progesztogének, mint a GES, gátló hatást fejtenek ki a citokróm P450 enzimekre [35]. A második generációs LNG, és a harmadik generációs GES androgén és anti-ösztrogén hatással is rendelkezik [9,11,31,36,37]. Ezzel szemben az újabb generációs progesztogének, mint a DRO, sokkal specifikusabban kötődnek a PR-hoz és minimális mellékhatásaik vannak, melyeket MR-ral való interakcióban váltanak ki.

1. táblázat A kísérleteink során alkalmazott progesztogének valamint az általuk kifejtett receptor aktivitás relatív kötődési affinitásban kifejezve (RBA - a progeszteronhoz viszonyítva). [9,24,31,34,38].

Osztályozás		Progesztogén		Receptoraktivitás		
Szerkezete származik		PR (RBA)	ER (RBA)	AR (RBA)	GR (RBA)	MR (RBA)
Természetes progesztogén	PRG	+ (100)	- (0,5)	- (3)	- (11)	+ (1000)
Tesztoszteronból (Gonánok)	LNG	+ (323)	- (0)	+ (58)	- (7,5)	- (17)
	GES	+ (864)	- (0)	+ (71)	+ (38)	+ (97)
Spironolaktonból	DRO	+ (70)	- (0,5)	- (2)	- (3)	+ (100)

A kísérletek során alkalmazott hormonok metabolizmusa emberben

A progesztogének és metabolitjaik elsősorban a vese kiválasztó rendszerén keresztül eliminálódnak a szervezetből [3,31]. A természetes **PRG** számos metabolittá alakul, melyek közül a pregnándiol a legjelentősebb vizeletben jelenlévő metabolit [39,40], azonban ez nem mutat farmakológiai aktivitást. Egyéb metabolitok közül a 17-hidroxiprogeszteronnak és a 20-alfa-dihidroprogesteronnak [31] van progesztogén aktivitása. A második generációs **LNG** főleg a májban metabolizálódik redukcióval glükuronizációt követően. A metabolitok a 3 α ,5 β -tetrahydroLNG, a 3 α ,5 β -tetrahydroLNG és a 16 β -hidroxitetrahydroLNG. A LNG és metabolitjai leginkább

szulfát konjugátumok formájában (25%), vagy glükuronid formában (32%) szekretálódik, 20%-ban azonban nem konjugált formában távozik az emberi szervezetből. Stanczyk és Roy [41] szerint a 3α - 5β -tetrahydroLNG glükuronid a legfőbb vizeletben jelen lévő metabolit. Az irodalomban fellelhető adatok szerint a harmadik generációs **GES-nek** csak 1%-a választódik ki a vizelettel változatlan formában, de arról nincs adat, hogy a konjugátumok milyen arányban ürülnek. Fő metabolitjai a dihidro-GES és a 3,5-tetrahydroGES, melyek mindegyike aktív metabolit [31]. A negyedik generációs **DRO** különleges szerkezete a vizelethajtó spironolakton molekulaszervezetéből ered. A DRO savas formában, valamint szulfát konjugált és konjugálatlan 4,5-dihidroDRO formájában metabolizálódik. Az első két forma biológiailag inaktív, de nincs adat a konjugálatlan 4,5-dihidroDRO potenciális hatásáról [24,31].

2.2 Fogamzásgátló hatóanyagok előfordulása a természetes vizekben

Habár a ma használatos harmadik és negyedik generációs tabletták hatóanyag tartalma az első generációs szerekhez képest azok ezred részére csökkent (μg a mg helyett), a kiterjedt és nagymértékű felhasználásból, valamint az elégtelen, alacsony hatásfokú szennyvíztisztításból adódóan hatóanyagaik megjelennek a környezetünkben. Potenciális veszélyt a szennyvízbe kerülő, biológiailag aktív metabolitok és az originális vegyületek okoznak, de a hazai, általában háromlépcsős szennyvíztisztító rendszerek (fizikai szűrés, biológiai bontás és kémiai fertőtlenítés), néhány esettől eltekintve, nem alkalmazzák a szteránváz elbontásához szükséges UV fény besugárzást. Azonban meg kell említeni, hogy a külföldön rutinszerűen alkalmazott UV roncsolás megítélése kérdéses manapság, mert egyre több tanulmány arról számol be, hogy ugyan a szteránváz elbontható, de még veszélyesebb, nagyobb toxicitású, többségében ismeretlen molekulák keletkeznek [42,43]. Mindemelllett az UV roncsolás hazai viszonylatban újabb költségeket tenne hozzá az alkalmazott szennyvíztisztítási eljárásokhoz.

A progesztogén szennyezés másik fő forrása az állattartó telepek elfolyói, amiben egyrészt az állatok által ürített természetes PRG és metabolitjai találhatók, másrészt androgén hatásprofilal rendelkező progesztogének, melyeket növekedésserkentőként alkalmaznak. Hal akvakultúrák, amelyek vizeiket közvetlenül az egyes természetes vizek vízgyűjtő hálózatába engedik, szintén használnak progesztogén vegyületeket növekedésserkentőként [6,44,45,46]. Fontos megjegyezni,

hogyan tudunk arról, mi történik a legtöbb alkalmazott progesztogénnal a szennyvízkezelés alatt, azonban az analitikai technikák fejlődésének köszönhetően egyre több szennyvíz be- és kifolyóból, természetes és ivóvízből kimutatják a progesztogének eredeti formáit, vagy aktív metabolitjait. A legmagasabb progesztogén koncentrációt (100 – 10 000 ng/L) állatfarmokhoz tartozó vízelvezetőkből mutatták ki Kínában és az Egyesült Államokban [6,9,47]. Alacsonyabb koncentrációt (1 – 100 ng/L) mértek a WWTP be- és kifolyóiban, habár sajnálatos módon a szennyvíz tisztító eljárás előtti és utáni koncentrációkban kevés különbség volt kimutatható. Az ökotoxikológiai szempontból releváns felszíni vizekben a kimutatott progesztogének koncentrációi a WWTP kifolyók értékeit közelítik, ahhoz hasonlóak. Európában először Aherne és mtsai [48] mértek ki progeszteront az ivóvízből immunoassay technikával 6 ng/L koncentrációban, valamint még ebben az évben megjelent az első olyan összefoglaló közlemény, amiben szex-szteroidok jelenlétét írták le szennyvíz kifolyóban, folyókban, ivóvízben 5 – 10 ng/L koncentrációban [7].

Folyókban, patakokban, tavakban és a talajvízben a PRG, LNG, GES és DRO jellemzően néhány ng/L koncentrációban detektálható világszerte [6,9,47,49,50,51,52]. Munkacsoportunk az MTA Ökológiai Kutatóközpont Balatoni Limnológiai Intézetének infrastrukturális és intellektuális háttérét kihasználva, együttműködésben a PTE ÁOK Orvosi Kémiai és Biokémiai Intézetével, feltérképezte Magyarország gazdasági szempontból kiemelt üdülőövezetének, a Balaton régiójának lehetséges progesztogén terheltségét. Eredményeink szerint a Balaton és a Zala folyó vízgyűjtő területén PRG (0,23-13,67 ng/L), LNG (0,85-3,40 ng/L) és DRO (0,26-4,30 ng/L) található az 53 mintavételi pontból 21 helyen [53].

2.3 Fogamzásgátló hatóanyagok hatásai gerinctelen és gerinces vízi állatokban

Az ökoszisztémába bekerült szennyezések jelentős részét a természet képes eliminálni, azonban a stabil kémiai szerkezettel rendelkező vegyületek, mint amilyenek a szteránvázis progesztogének is, biológiailag nem, vagy csak igen nehezen bonthatók. Elsősorban a zsírolékony, ciklusos vegyületekre jellemző, hogy akkumulálódnak a vizekben, azok üledékében, a talajban, végső soron az élő szervezetekben [51]. Ennek eredményeként, a vízi gerinces és gerinctelen nem-célszervezetek hormonális szabályozását károsítják, bennük endokrin diszruptiót okoznak. Az ED-ok definíció szerint olyan exogén anyagok, vagy azok keveréke,

amelyek megváltoztatják az endokrin rendszer funkcionális működését, aminek következtében kedvezőtlen hatást gyakorolnak az egyedre, vagy annak utódaira, így az egész populációra. Olyan, alacsony toxicitású anyagok, amelyek akár egyetlen esetben előfordult expozíciót követően is megváltoztatják az egyed életminőségét, életképességét. A kialakuló endokrin diszrupció következménye a folyamatosan csökkenő fajszám, illetve egyes fajok lokális kipusztulása, az ivari fejlődés rendellenessége, a zsíryanycsere felborulása, a fejlődési folyamatok megzavarása. Ilyen ED-oknak minősülnek a természetes vizekből eredeti formájukban visszamérhető progesztogének, amelyek bioakkumulációját a zebrakagylóban (*Dreissena polymorpha*) és a szivárványos pisztrángban (*Oncorhynchus mykiss*) is leírták [3,16,17].

Az OECD a gerinctelenek közül a kis vízibolhát (*Daphnia pulex*), [54] és a nagy mocsári csigát (*Lymnaea stagnalis*) [55], a gerincesek közül pedig a dél-afrikai karmosbékát (*Xenopus laevis*) [56] és a zebradániót (*Danio rerio*) [57] is ajánlja modellszervezetként az ED-ok hatásának vizsgálatára. A gerinctelenek közül *L. stagnalis*-on végeztek ilyen toxicitás tesztekét ösztrogén receptoron ható, de nem szteránvázas ED vegyülettel (TBT, festékalapanyag) [58,59]. Ennek eredménye szerint a TBT krónikus kezelésben (100 – 300 µg/L) csökkentette a lerakott petezsákok számát, késleltette az embriók kikelési idejét, valamint csökkentette a sikeres kikelési rátát. PR-on ható, de nem szteránvázas ED vegyület (VZ, gombairtó szer), valamint a progesztogén típusú, szteránvázas CPA hatását vizsgálták felnőtt *L. stagnalis*-on és *Daphnia magna*-n is. [25,60,61,62,63]. Ezek az anyagok *L. stagnalis*-ban csökkentették az egy petezsákba rakott tojások átlagos számát, valamint poliembrióniás tojások gyakoribb megjelenését okozták (VZ: 3,8 – 92,2 ng/L és CPA: 2,5 – 28,7 µg/L; krónikus kezelés). *D. magna*-ban ugyanezek az anyagok szignifikánsan csökkentették a hímek számát (1 mg/L VZ szubkrónikus kezelés), lassult a növekedés, csökkent a költőtasak mérete és az utódok száma (1,2 – 5 µg/L CPA krónikus kezelés). Az általunk is használt progesztogének, mint környezetszennyezők, élettani hatását puhatestűekben még nem vizsgálták. A gerinctelen kerekeshímnél (*Brachiorus manjavacas*) PRG-nal végeztek kísérleteket [64], melyekben azt tapasztalták, hogy az alacsony és közepes koncentrációjú (5 és 10 mg/L) kezelésben fokozatosan emelkedett a tojástermelés, azonban a magas koncentrációjú (14 mg/L) PRG expozícióban nullára csökkent. A PRG az egyedek növekedésére, párzási viselkedésére nem volt hatással. Azonban a kísérletben használt

hormon koncentrációk a környezeti szempontból releváns tartományt (ng/L) nem is közelítik, annál hat nagyságrenddel magasabbak (mg/L).

A progesztogén szennyezés vízi gerinces fajokra gyakorolt élettani hatásáról több ismeretanyag áll rendelkezésünkre, mint a gerinctelen fajok esetében. Elsősorban kételtűekben és halakban írtak le az élettani hatások mellett, morfológiai és molekuláris változásokat is, amelyek elsősorban a reprodukciót érintették. Annak ellenére, hogy alacsonyabb rendű gerincesekről van szó, a HPG tengely endokrin szabályozása már megtalálható, amely a progesztogének támadáspontjául szolgálhat. Ez a HPG tengely szabályozza többek közt a szexuális differenciálódást, az ivarsejtek érését és a párzási viselkedést is. A hipotalamusz által termelt GnRH az agyalapi mirigy gonadotropin szekrécióját (FSH, LH) stimulálja. Az FSH és az LH a gonádokon hatva stimulálják azok szex-szteroid szintézisét és felszabadítását (androgének, ösztrogének, progeszteron). Ezek a véráramba kerülve hatnak a célsejtek receptorain keresztül, valamint negatív visszacsatolással szabályozzák a hipotalamuszt és az agyalapi mirigyet, fenntartva a szervezet hormon háztartásának homeosztázisát [56,65].

Zhao és mtsai [57] azt vizsgálták, hogy 21 napig tartó PRG (100 – 10 000 ng/L) és DRO (500 – 20 000 ng/L) kezelés hatással van-e a HPG tengely által szabályozott folyamatokra *Danio rerio* agyában és ivarszerveiben. Eredményeik szerint alulszabályozódott a *gnrh3* és a *cyp19* gének transzkripciója az agyban, a *hsd11b2* pedig a petefészekben magas dózisu PRG kezelésben (742 ng/L). Közepes és magas dózisu DRO kezelés (2763 és 13 650 ng/L) hatására az agyban a *cyp19b* alul-, a petefészekben a *hsd11b2* gén alul-, a *cyp19a* gén átírása pedig felül-szabályozódott. Ezek a gének kódolják az mGnRH3 neuropeptidet, ami a petesejt termelést befolyásolja, valamint a CYP19 enzimet, ami az androszténdion – ösztrogén, illetve a tesztoszteron – ösztrogén átalakulást katalizálja, és a 11 β -HSD2 enzimet, amely a kortizol – kortizon átalakítást végzi. Ezek alulszabályozódása a szervezetben csökkent gaméta termeléshez, androszténdion és tesztoszteron túlsúlyhoz, valamint kortizol túlsúlyhoz vezet. Összhangban a géntanszkripciós eredményekkel, azt tapasztalták, hogy magas dózisu PRG kezelés, valamint közepes és magas dózisu DRO kezelés szignifikánsan csökkentette a halakban a teljes petesejt számot a kezelés utolsó hetében. Más progesztogén kezelést alkalmazó tanulmányok is arról számoltak be, hogy 21 napos LNG és GES (100 ng/L) kezelés hatására csökkent a petesejt termelés, valamint hím nemi jelleg megjelenése, maszkulinizáció volt megfigyelhető felnőtt

nőstény tűzcsellékben (*Pimephales promelas*) [11] és tuskés pikóban (*Gasterosteus aculeatus*) (6,5 ng/L LNG) [36]. Habár ezek a folyamatok is a HPG tengely szabályozása alá esnek, leírták, hogy a LNG kezelés (312,4 és 3124 ng/L) eltérően hatott a génexpresszióra a különböző tesztállatokban. Dél-afrikai karmos béka (*X. laevis*) nőstényekben és hímekben egyaránt csökkentette az *lhb* gén, a hímekben pedig növelte az *fshb* gén expresszióját [66]. Hím és nőstény bodorkákban (*Rutilus rutilus*) viszont növelte az *lhb* gén és csökkentette az *fshb* gén expresszióját [67]. Azonban mindkét tesztállatban az ivarszervek károsodását figyelték meg a kísérlet során, megváltozott a herék és a petefészkek morfológiai és hisztológiai képe, melyet tűzcsellében is leírtak 21 napos LNG (0,8 – 29,6 ng/L) és DRO kezelés (0,33 – 70 µg/L) hatására [68,69]. Utóbbi tanulmányban az expozíciónak kitett halak heréiben megnagyobbodott csatornákat figyeltek meg, tele érő spermatidával, azonban a here szövetében sorvadt Leydig és Sertoli sejtek jelentek meg. Hímekben fiziológiásan az LH hat a Leydig sejtekre, amelyek a tesztoszteron termeléséért felelősek, az FSH pedig a Sertoli vagy dajka sejtekre, amelyek a CYP19 – aromatáz – enzim segítségével a tesztoszteronból ösztrogént állítanak elő. Az ösztrogén a spermiumok megfelelő mennyiségét és motilitását garantálja. A petefészkek szintén megnövekedtek a kezelés hatására, de bennük a késői stádiumban lévő petesejtek aránya felére csökkent. Degenerált vitellogenikus petesejtek és atretikus tüszők jelentek meg, csökkent az elsődleges petesejtek száma, valamint drasztikusan visszaesett az érett vitellogenikus stádiumban lévő petesejtek száma. A spermium és petesejt egyesülésének gátlását, azaz a sikeres megtermékenyítést már 7 napos LNG (1 – 100 ng/L) kezelés hatására is leírták ebben a fajban [70]. A progesztogének tehát az ivarsejtek végső érését is befolyásolják. A petesejtek esetében potenciális támadáspontjuk lehet például a PRG szignalizációs útvonala, ugyanis a PRG úgy szabályozza a petesejtek érését, hogy befolyásolja a meiózist (a petesejt végső érése, G2/M fázis átmenet), melyet a sejtmag osztódása előz meg [71]. A G2/M fázis átmenettől nevezik érett petesejtnak, amely a második meiotikus osztódásban megáll, a további osztódást már a megtermékenyítés indítja meg. Érés közben azonban a petesejtek számos fázison mennek át, az egyik ilyen folyamat a vitellogenikus szakasz a végső érettség elérése előtt, melyben a petesejt termel, valamint a környezetéből felvesz VTG-t. Ez egy apoláros molekuláris hordozó és tároló fehérje, ami lipideket, peptideket és vitaminokat képes kötni, ezáltal az utód fejlődését szolgálja.

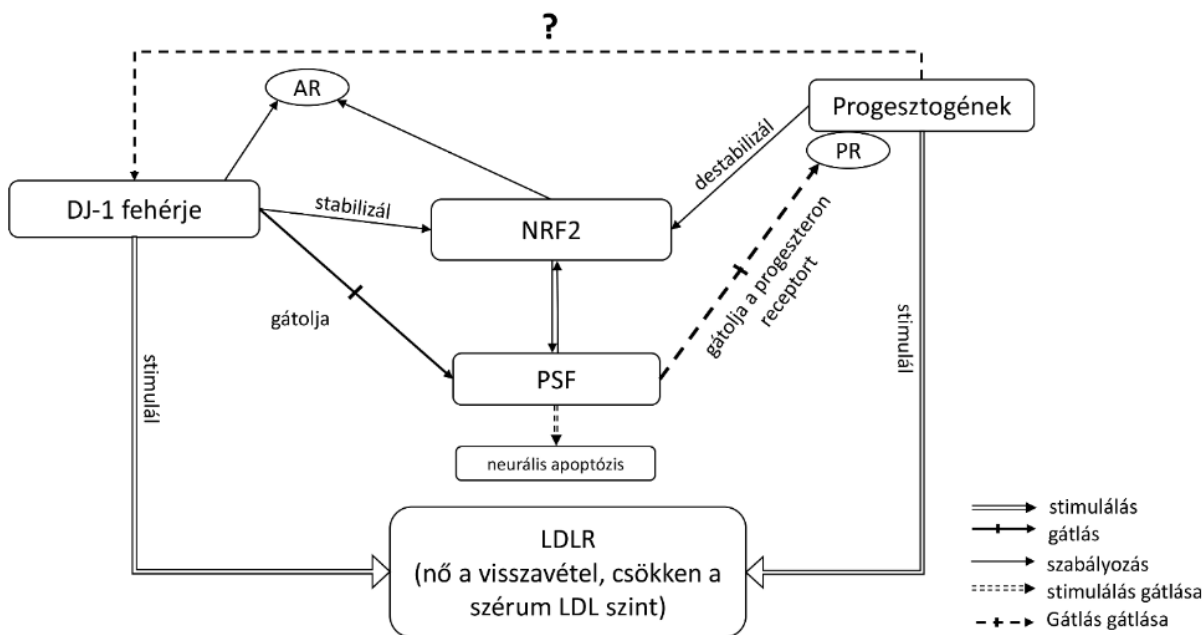
A vitellogenezis folyamata, a VTG transzportja és annak felhasználása a halakban már jól ismert [72]. A szintézis csontos halakban főleg a májban zajlik, a szintetizálódott VTG a vérbe választódik ki, majd az érett petesejtekben halmozódik fel. Gerinctelenekben szintén leírták ezt a folyamatot, de ezekben a fajokban (pl. óriás almacsigában, tüskés bolharákban) a hemolimfában található VTG-szerű fehérjék forrásaként egyéb szerveket, pl. a középbél mirigyet (hepatopancreas) és a fehérjemirigyet (glandula albuginea) jelölték meg [73,74].

A vitellogenezis folyamatát számos jelátviteli út befolyásolja. Ilyen pl. a *L. stagnalis*-ban is jól ismert inzulin jelátviteli út (ISP) [75], amely a szervezet evolúciósan konzervált tápanyag szenzora, hatással van a glikolízis/glükoneogenezis folyamatára, a sejtciklusra és az apoptózisra is. Ezen kívül az ISP befolyásolja a foszfatidilinozitol 3-kináz – protein-kináz B (PI3K-PKB) jelátviteli útvonalat, amely a VTG szintézis fő szabályozója és *L. stagnalis*-ban szintén ismert [76,77]. A VTG szintézis nem csak megfelelő szénhidrát ellátottság esetén indul be, hanem megfelelő aminosav raktár is szükséges hozzá, ezt támasztja alá, hogy az aminosav érzékelő jelátviteli út (Target Of Rapdamycin) a PI3K/PKB jelátviteli út fő szabályozója. Mindezeket figyelembe véve elmondható, hogy az inzulin jelátviteli út szinkronizálja a vitellogenezist az elérhető cukor és aminosav szint függvényében, amelyek szükségesek a szintézishez. Összegezve, a nőtények reprodukciós képességének szükséges feltétele a szervezet tápanyag ellátottságában bekövetkező pozitív változás [78,79,80,81].

Gerincesekben a VTG-t kódoló génszakasz megtalálható hím és nőtény egyedekben egyaránt, de ivarérett nőtényekben, amelyek magas szérumszintű 17 β -ösztradiol szinttel rendelkeznek, a funkcióképes VTG nagyobb mértékben expresszálódik. Az emelkedett VTG-szerű fehérje és VTG szint elsősorban környezeti ösztrogén szennyezést jelez pl. felsőbbrendű rákokban, puhatestűekben és halakban is [15,74,82,83,84,85], míg androgének hatására jelentősen lecsökken [8,82,86]. Sajnálatos módon, az eddigi tanulmányok szerint a VTG változó szintet mutat progesztrogén szennyezés esetén, az alkalmazott koncentráció és a progesztogén típusának függvényében. Például, 55 ng/L DRO-t alkalmazva növekszik, azonban 55 ng/L DRO és 3,5 ng/L PRG együttes alkalmazásával csökken a VTG koncentrációja, ugyanakkor 553 ng/L DRO csökkenti, de 553 ng/L DRO és 33 ng/L PRG együttes adása viszont növeli a VTG szintet nőtény zebrafishokban [19]. További tanulmányok szerint a 0,5 és 5 ng/L LNG kezelésnek nincs hatása, de a 25 ng/L LNG

már szignifikáns növekedést okoz, míg a 100 ng/L-es koncentráció szignifikánsan csökkenti a plazma VTG szintet tüzcsellékben [8,11].

A VTG szint változásáról szóló, egymásnak ellentmondó irodalmi adatok felvetik egy új, progesztogén szennyezésben megbízhatóan alkalmazható célmolekula szükségességét. Erre olyan molekula lehet megfelelő, amely evolúciósan konzervált régiókat tartalmaz, emiatt a fajok széles körében megtalálható, független a nemtől, valamint több szövettípusban is expresszálódik. Ilyen molekula pl. a DJ-1 védő fehérje, mely az emberi szervezet szinte minden sejtjében expresszálódó deglikáz protein. Fontos szerepet tölt be az oxidatív stressz elleni védelemben, a sejt túlélésben, a proliferációban és a gén transzkripcióban. Emellett evolúciósan konzervált régiói is vannak, jelenlétét gerinctelen és gerinces fajokban egyaránt leírták, úgymint kagylóban (*Crassostrea gigas*) [87], csigában (*L. stagnalis*) [88], fonálféregben (*Panagrolaimus superbus*) [89], ecetmuslicában (*Drosophila melanogaster*) [90,91,92], továbbá számos hal- [93,94,95,96,97,98] és madárfajban [99] is.



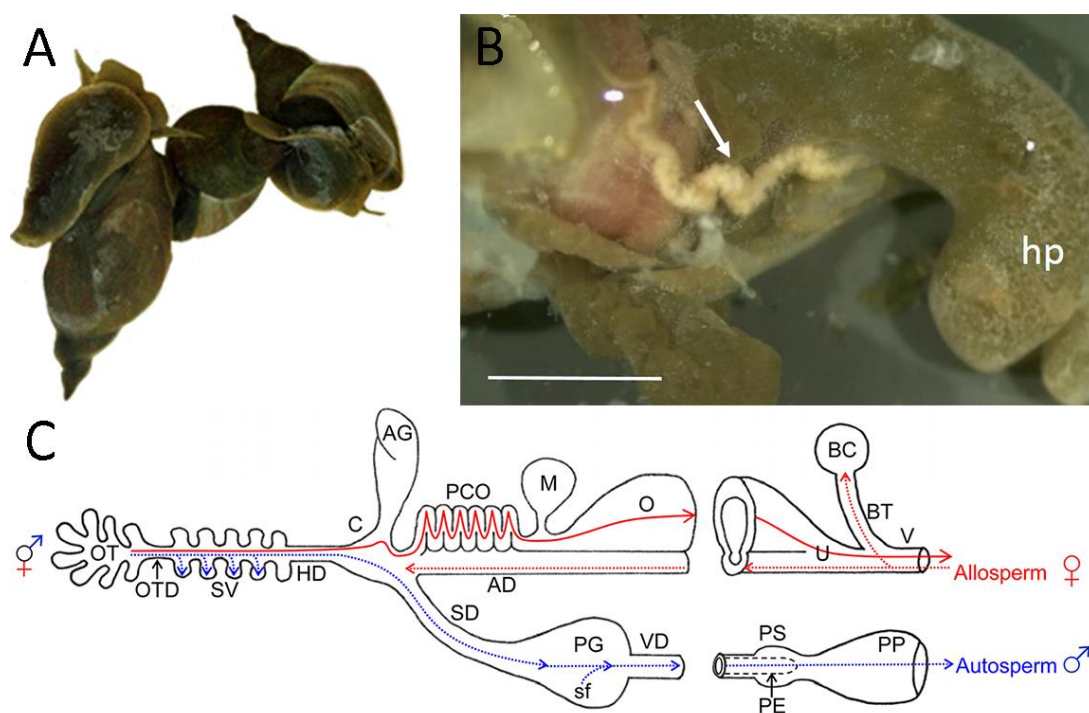
1. ábra A progesztogének és a DJ-1 fehérje közös célmolekulái és lehetséges kapcsolódási pontjai. Az ábra mutatja a lehetséges közös hatásukat a metabolikus egyensúlyra (LDL visszavétel a szérumból), a sejtmagi E2-függő faktor 2-re (NRF2) és a polipirimidin szakaszt-kötő fehérje-asszociált splicing faktorra (PSF).

A DJ-1 fehérje és a szteroid hormonok számos közös támadásponttal rendelkeznek, úgy, mint a nukleáris faktor eritroid 2 – kapcsolt faktor 2 (NRF2) [100,101], a polipirimidin traktus-kötő fehérje asszociált splicing faktor (PSF) [102,103] és az alacsony-denzitású lipoprotein (LDL) receptor [104] (**1. ábra**). Mind a DJ-1, mind az NRF2 szabályozza az androgén receptorokat [101,105,106]. A DJ-1

gátolja a PSF-t, amely transzkripció csendesítő aktivitással rendelkezik és stimulálja a neurális apoptózist [103]. Továbbá megfigyelték, hogy a PSF negatívan szabályozza a PR-t [102]. Így a DJ-1 fehérjének indirekt módon, a PSF gátlásán keresztül neuroprotektív és PR-ra kifejtett hatása is van. Ezenkívül, a DJ-1 neuroprotektív hatást fejt ki az NRF2 fehérje stabilizálásával, amely antioxidáns hatású és a transzkripció fő szabályozója, ezáltal védi a sejteket az oxidatív stressz indukálta apoptózistól [100]. Ezek alapján azt feltételezzük, hogy a progesztogén kezelés képes emelni a DJ-1 fehérje szintjét, ezáltal indirekt módon hatni a közös cél receptorokra.

2.4 A kísérleti állatok bemutatása

A nagy mocsári csiga, *Lymnaea stagnalis*



2. ábra A nagy mocsári csiga (*Lymnaea stagnalis*) (A) habitusképe; (B) A középbél mirigy (hp) proximális felén futó ondóvezeték (SV - nyíl). Méretskála: 1 cm; (C) A szaporító szervrendszer általános felépítése és a gaméták útja *L. stagnalis*-ban. AD – allosperm vezeték; AG – fohérje mirigy; BC – közösülő tasak; C – megtermékenyítési tásk; HD – hermafrodita vezeték; M – nyákelválasztó mirigy; O – tojástok mirigy; OT, ovotestis; P – pénisz; PCO – kanyarulat csatorna; PE – preputium; pf, perivitellin fluid; PG – prostata mirigy; SD – spermium vezeték; sf – ondófoladék; SV – ondóvezeték; V – vagina vezeték; VD, vas deferens [Forrás: 108].

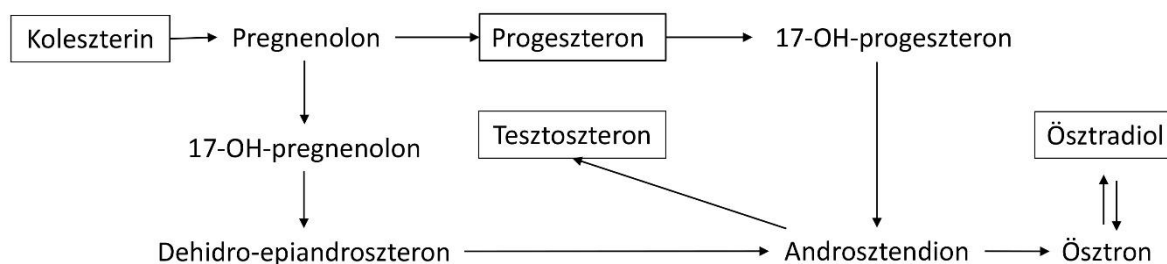
A *L. stagnalis* a csigák (Gastropoda) osztályába, a tüdőcsigák (Pulmonata) rendjébe és a *Lymnaeidae* családba tartozó általánosan elterjedt csigafaj. Közép és Észak-Európától délkeleti irányban Kis-Ázsián át Indiáig előfordul, valamint Észak-

nyugat Afrikában is megtalálható az álló- és lassú folyású vizekben, folyókban, tavakban, valamint mégél mesterséges tavakban, akváriumokban is. Métély csigának is nevezik, ugyanis a Magyarországon előforduló csigák nyolcvan százaléka májmetéllyel fertőzött, annak közti gazdája. A parazita jelenléte megnöveli a *L. stagnalis* méretét, a fertőzött csigák háza eléri a 4-5 cm-t, de laboratóriumi körülmények között a nem fertőzött egyedeké csak 2-3 cm. Sok más fajtól eltérően egyedülálló, háromszög alakú tapogatói vannak, melyek oldal irányban lapítottak, tövükben egy pár szem helyezkedik el. Főleg tüdővel lélegzik a vízfelszínen, emellett a békákhoz hasonlóan bőrlégzésre is képes. A dús növényzetet kedveli, szerves üledékkel, algával, olykor foszló állati tetemekkel táplálkozik, átlagos élettartama kedvező feltételek mellett 2-3 év [107].

A *L. stagnalis* amellet, hogy a neurobiológiában általánosan használt modellállat, szaporodás-biológiája is alaposan tanulmányozott és jól ismert (**2. ábra**) [108,109,110,111,112]. Mint a csigák többsége, ez a faj is hímnős, szervezetében jelen van a hím és nőstény reprodukciós rendszer egyaránt. Habár képes az önmegtermékenyítésre, a genetikai sokszínűség érdekében preferálja a párzást más egyedekkel. A különálló genitális nyílások az egy irányba történő megtermékenyítést teszik lehetővé, ahol az aktus során az egyik egyed nőstényként, a másik pedig hímként viselkedik. Emiatt a reprodukció neuroendokrin szabályozása is elkülönül hím és nőstény szabályozásra [108], amely a CNS funkcionális lateralizációjában is megjelenik. A belső megtermékenyítés után tojásait petezsákban helyezi el. Peterakáskor 50-100 tojást helyez szabályos rendben egy átlátszó, kocsonyás masszába, mely a tojások védelmét látja el. A petezsákokat a növények szárára, kövekre rögzíti. A tojásokban 10 nap alatt minden egyed átmegy blasztula, gasztrula, trochophora és veligera állapotokon, majd a kikelési idő felénél metamorfózison, amely során az egész test meghajlik (flexió) és elcsavarodik (torzió) [109,110]. Szabadon élő lárvastádium nincs, a kikelt állat táplálék kereső életmódot folytat, testfelépítésben a felnőtt egyed kicsinyített mása, de szaporodásra még nem képes, az ivarérettséget csak a kikelés utáni harmadik hónapban éri el.

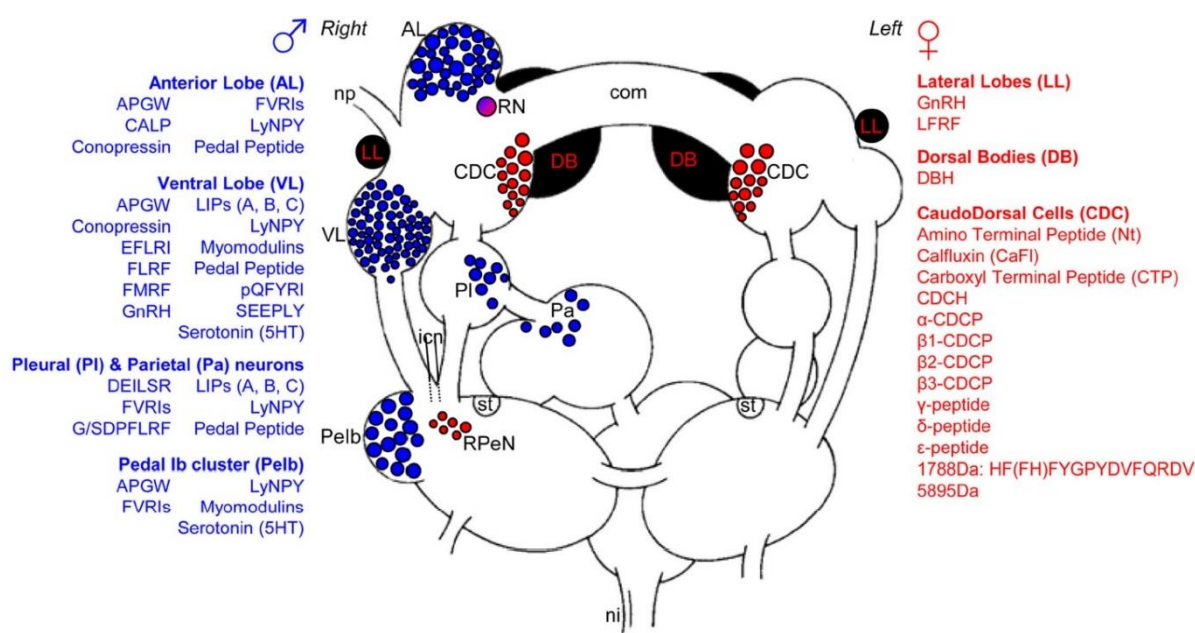
Irodalmi adatok szerint a gerincesekben található szteroidok jelen vannak puhatestűekben is, de egymásnak ellentmondó bizonyítékok vannak arról, hogy csak a környezetből veszik fel, vagy képesek szintetizálni azokat [113]. A szteránvázas koleszterint, amely közvetlen prekürzora a P5-nak, kimutatták a *L. stagnalis*-ban is [114]. A gerincesekben megtalálható szteroid hormonok bioszintézisének (pl.

progesztogének, ösztrogének, androgének, mineralokortikoidok) kezdő és kulcsmolekulája a P5. Ezeket a szteroid hormonokat puhatestűekben is funkcionális hormonoknak vélik [113]. Kimutatták, hogy a *L. stagnalis* képes a hozzáadott P5 molekulát PRG-ná alakítani [115]. Fernandes [116], valamint Scott [113] összegezték a gerincesek szteroid hormonjainak lehetséges bioszintézisét puhatestűekben (**3. ábra**). Ezen tanulmányok alapján valószínűsíthető, hogy az antropogén eredetű progesztogének hatást fejtenek ki a puhatestűekben.



3. ábra Szteroid hormonok szintézise puhatestűekben [113,116]

A reprodukció szabályozását azonban más neuroendokrin hormonoknak (pl. APGWa, FLRFa, FMRFa, DBH, CDCH) tulajdonítják, amelyek termelődése elkülönül a központi idegrendszer egyes területein hím és nőstény reprodukcióért felelős neuronokra, ez a funkcionális lateralizáció [108, 117] (**4. ábra**). A hím reprodukcióért felelős szabályozó régiók jellemzően a központi idegrendszer jobb oldali idegdúcaiban helyezkednek el, tükrözve, hogy a hím reprodukciós szervek is a test jobb oldalán találhatók. Ezek a RCG elülső (anterior) és hasi (ventralis) lebenyei, a RPeG Ib klaszterében elhelyezkedő sejtcsoportja [118], valamint a RPG és RPIG azonosított, neuropeptid (pl. APGWa, FLRFa, FMRFa, LIP, miomodulin) termelő sejtjei. A nőstény reprodukcióért felelős azonosított régiók az CG-ban lokalizált CDC-k, a két agydúcot összekötő kommissúra (hormon tárolás), a dorzális-testek (DBH termelés), valamint a RPeG egyes motoros neuronjai, melyekre a CDCH gátló hatással van [108,119].



4. ábra A reprodukció szabályozása, funkcionális lateralizáció *L. stagnalis*-ban
[Forrás: 108]

A *L. stagnalis*-ban a GnRH-szerű neuropeptid felelős a nőstény és a hím reprodukció szabályozásáért egyaránt [108], de a pontos szerepe a csigákban még nem tisztázott. Az elnevezés egy olyan peptid családot takar, amely neuromodulátorként felelős a reprodukciós viselkedés szabályozásáért. Gerincesekben és előgerinchúrosokban 16 féle GnRH altípust azonosítottak [120], de alacsonyabb rendű fajokban (pl. csendesóceáni osztriga, lila tengerisün, óriás édesvízi garnéla, tritonkürt csiga) is kimutattak GnRH-szerű peptideket [121]. A legtöbb fajban legalább 3 féle GnRH analóg található, amelyek a következő csoportokba sorolhatók: GnRH1 (emlős GnRH), GnRH2 (csirke GnRH), valamint GnRH3 (lazac GnRH). A gerincesekben található GnRH tartalmaz konzervált és variábilis régiókat, aminosav helyeket. Variábilis régiók jellemzően a 2., 3., valamint az 5-8. aminosav pozíciók. A humán GnRH1-hez képest azonban a puhatestűekben eddig kimutatott GnRH-szerű peptidek a 3., 5., 7., 8. és 9. helyeken mutattak aminosav eltérést. A puhatestűeken belül a GnRH-szerű peptid analógok variábilis régiói a 8. és 9. aminosav helyen található (2. táblázat).

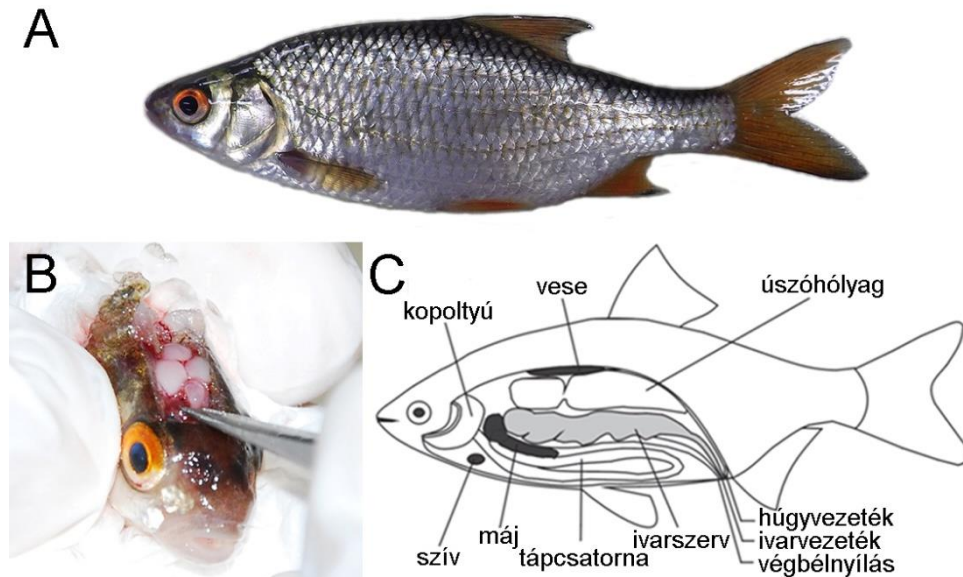
2. táblázat A humán GnRH1 analóg és egyéb, puhatestűekben található GnRH-szerű fehérje analógok szekvenciái [122]. Sötét szürke háttérrel kiemelve a humán GnRH analógok konzervált régiói, világos szürke háttérrel kiemelve a puhatestűek GnRH-szerű fehérje analógjainak a humán GnRH1-gyel azonos aminosav szakaszai. A szekvencia egyezés és hasonlóság (helyettesíthető aminosavak) adatok a www.ebi.ac.uk weboldaltól származnak.

FAJ	GNRH SZEKVENCIA	MW [g/mol]	EGYEZÉS [%]	HASONLÓSÁG [%]
<i>Homo sapiens</i>	pEHWSYGIRPG	1182.4		
<i>Haliotis laevigata</i>	pEHFSNGWHAG	1122.5	44,4	55,6
<i>Biomphalaria glabrata</i>	pEHFSNGWYAG	1148.5	44,4	55,6
<i>Aplysia californica</i>	pEHFSNGWYAG	1148.5	44,4	55,6
<i>Haliotis asinina</i>	pEHFSNGWYPG	1174.5	55,6	66,7

Az eddigi tanulmányok szerint GnRH-szerű peptidet expresszáló sejtek *L. stagnalis*-ban az L/RCG hasi és oldalsó lebenyében, valamint a VG és RPG-ban található. Az immunoreaktív neuritek a LCG-ból a pénisz idegen keresztül, a VG-ből pedig az bél (intestinalis) idegen keresztül lépnek ki [108,123]. Kagylókban valószínűsítik, hogy a CG-ban termelődő GnRH a keringési rendszerbe kerülve eléri és stimulálja a perifériás ösztrogén termelő sejteket, melyek a spermatogonium proliferációját indukálják [124]. A *L. stagnalis* perifériás idegrendszerében a péniszt beidegző idegben mutatták ki a GnRH jelenlétét IHC módszerrel, ami a hím reprodukció irányításának túlsúlyát valószínűsíti [108,123]. Nyilvánvalóan a hermafrodita életmód a szexuális funkciók szigorú szabályozását követeli. Ennek több változatát is leírták. Például a hím reprodukciós neuropeptidok (pl. FMRFa, APGWa, stb.) hiperpolarizálják a nőstény reprodukcióért felelős CDC-ket a CG-ban, így az általuk termelt CDCH nem ösztönzi az egyedek tojáshozzásra. Ugyanezek a neuropeptidok gátolják a CG ún. LGC (Light Green Cells) sejtcsoportját [112] az inzulin-szerű hormon termelésében, ezáltal befolyásolják az energiaraktárak felhasználását és az energiát a növekedés helyett a reprodukcióra összpontosítják. A neurotranszmitterek egyeden belül hatnak, ugyanakkor allohormonokkal képesek a párzásban résztvevő másik egyed reprodukciós szabályozását is befolyásolni. Az aktus során átjuttatott ondófoladék olyan peptideket (pl. LyAcp5, ovipostatin) tartalmaz,

amelyek képesek elfolytani, vagy eltolni a hím nem érvényre jutattását a nőstény funkciók felé a másik egyedben, tehát az nagy eséllyel a következő aktus során is nőstényként fog viselkedni [125].

A bodorka, *Rutilus rutilus*



5. ábra Bodorka (*Rutilus rutilus*) (A) habitusképe; (B) A nyitott koponyájában látható agylebenyek; (C) Halak főbb belső szerveinek általános elrendeződése [Forrás: 126]

A közönséges bodorka, vagy búzaszemű keszeg a sugaras úszójú halak (*Actinopterygii*) osztályába, a pontyalakúak (*Cypriniformes*) rendjébe, ezen belül is a pontyfélék (*Cyprinidae*) családjába tartozó igen gyakori halfaj. Elterjedése a déli félszigeteket kivéve egész Európára jellemző, Magyarországon őshonos és a legáltalánosabban elterjedt halfaj. A Balatonban is rendkívül gyakori, tömegesen olyan állóvizekben és lassú folyású folyóvizekben él, ahol sűrű a növényzet, mivel elsősorban a hínáros életteret kedveli. Élőhelytől függően akár 7 évig is él, mérete 10-18 cm. Szemgyűrűje pirosas, háta zöldesszürke, hasa fehér, a páros úszók világos vörösek, a páratlanok szürkés vörösek. Algát, zooplankton, gyűrűsférgeket, víziászkát fogyaszt, a Balatonban élő ragadozó halak fontos zsákmánya. Szaporodását tekintve váltivarú, az ivarérettséget 3-4 éves kora körül éri el, áprilistól májusig szaporodik külső megtermékenyítéssel. A nőstény halak petesejtjeiket a víz alatti növényzetre rakják, azok száma halanként 20-200 ezer is lehet, átmérőjük 1-1,5 mm [126]. A hímek ezekre bocsátják a hímivar-sejteket tartalmazó haltejet.

A halakban már megjelenik funkcióképes rendszer a HPG tengely a hormonális szabályozó rendszer részeként. A hipofízis elülső lebenyének hormonjai ugyanúgy

hatnak az ivarszervekre, a mellékvesére, a hasnyálmirigyre és a növekedésre, mint az egyéb, magasabb rendű gerincesekben. A középső és hátsó lebeny hormonjai viszont az anyagcserét és a pigmentsejtek működését serkentik. A pajzsmirigynek megfelelő mirigy nem egységes szerv, tiroxin hormonja a növekedésre, a mozgási aktivitásra és az ivarérésre hat. A mellékvese diffúz szerv, kéreg és velőállománya elkülönülve helyezkedik el, adrenalint és szteroid hormonokat termel. A hasnyálmirigy szintén nem egységes szerv, az inzulin termelésért felelős. Az ivarmirigyek hormontermelése irányítja a halak szaporodását és befolyásolja a nehezen észlelhető másodlagos ivarjelleg [127]. A PRG-t korábban már lényeges hormonnak azonosították a nőstény halak reprodukciójának szabályozásában. Ebben a fajban a természetes progesztogén a $17\alpha,20\beta$ -dihidroxi-4-pregnen-3-on (DHP), amely a nőstény halakban felelős a petesejtek végső éréséért [128], míg hímekben a spermatogeneziséért és a spermiumok mozgási aktivitásáért felelős [129]. A PR-ok jelenléte és funkciója halakban ugyanúgy régóta vita tárgyát képezi, mint a puhatestűek esetében. PR génkiütött zebradánióban vizsgálták a LH jelátvitelt [130], valamint számos halfajon megfigyeltek genetikai hatásokat progesztogén kezelésben [131,132], ami valószínűsíti a PR jelenlétét és jelátviteli szerepét a bodorkában is. Emiatt a progesztogének hatására aktiválódó jelátviteli utak nagy hasonlóságot mutatnak az egyéb gerincesekben leírtakkal, ami a bodorkát alkalmas tesztállattá teszi a vízi progesztogén szennyezés hatásának vizsgálatában [133].

3 Célkitűzés

Az irodalmi áttekintés alapján célul tűztük ki a humán eredetű progesztogén hatóanyag-maradványok élettani hatásának felderítését nem-célszervezeteken, gerinctelen (csiga) és gerinces (hal) vízi állatmodelleket felhasználva. Elsősorban azt vizsgáltuk, hogy a hatóanyagok a környezeti szempontból releváns koncentráció tartományokban képesek-e fiziológiai funkciókat módosítani az állatokban. Másodsorban pedig egy valós környezeti szituáció vizsgálatára törekedtünk azáltal, hogy a hatóanyagokat keverékben alkalmaztuk kísérleteinkben. Ellenőrzött feltételek mellett zajló laboratóriumi vizsgálataink során 10 ng/L progesztogén kezelést alkalmaztunk, ami az édesvizek reális szennyezettség-értékét reprezentálja. Számos tanulmány arról számol be, hogy a progesztogén koncentráció ennél jóval magasabb is lehet a környezetben (több száz, vagy több ezer ng/L), ezért egyes kísérleteinkben vizsgáltuk az 50 ng/L és az 500 ng/L progesztogén keverék hatását is.

A következőket tűztük ki célul:

- Megvizsgáljuk, hogy a VTG, mint az ösztrogén szennyezés biomarkere, alkalmazható-e a progesztogén szennyezések kimutatására.
- Elemezzük, hogy a DJ-1 védő fehérje alkalmas jelzőmolekula-e progesztogén szennyezések kimutatására.
- Feltérképezzük a progesztogén kezelés hatását a *L. stagnalis*, mint hermafrodita faj, reprodukciós rendszerében, melynek során, vizsgálni kívántuk a reprodukció szabályozásáért felelős GnRH-szerű fehérje analógok eloszlását és expresszióját a központi idegrendszerben, a hím és nőstény ivarsejtek mennyiségének változását, valamint a lerakott petezsákok minőségét progesztogén kezelésben.
- Felmérjük a felnőtt csigák progesztogén kezelésének hatását az utódok életképességére, fejlődésére. Ennek során meghatározzuk a sejtosztódások időablakát az embrionális fejlődés korai szakaszában, valamint feltérképezzük az egy-sejtes zigóta és a tojás szikanyagának részleges metabolomikai összetételét.
- Leírni a progesztogén keverék szomatikus és molekuláris szintű hatásait a bodorkában, melyhez vizsgálunk testtömeg indexeket, valamint a szérum lipid szintek és egyes stressz fehérjék változását.

4 Anyagok és módszerek

4.1 Kísérleti állatok

4.1.1 Nagy mocsári csiga

A kísérleteinkhez használt 3-6 hónapos, ivarérett csigák két laboratóriumi tenyészetből származtak: MTA ÖK BLI, Tihany és The George Washington Egyetem, Kémiai Intézet, Washington, DC. Egyesült Államok, mivel a kapilláris mikromintavételi technikával kombinált tömegspektrometriás mérések egy része az említett külföldi laboratóriumban készült. Az állatokat mindkét helyen ugyanolyan kondíciók mellett tartottuk [alacsony réz-tartalmú, sóval pótolta reverz ozmózzissal tisztított víz – 0,1309 mM NaHCO₃, 0,0378 mM K₂SO₄, 0,4013 mM CaCl₂·2H₂O, 0,0390 mM Mg(NO₃)₂·6H₂O, folyamatos levegőztetés, 12 órás fény-sötét ciklus, hetente három alkalommal etetés salátával]. Az állatokon végzett minden kísérlet az MTA ÖK Balatoni Limnológiai Intézetének Munkahelyi Állatjóléti Bizottsága által kidolgozott és engedélyezett eljárások szerint történt (VE-I-001/01890-10/2013), törekedve arra, hogy minimálisra csökkentsük az állatok szenvedését és minél kevesebb egyedet használjunk fel.

4.1.2 Bodorka

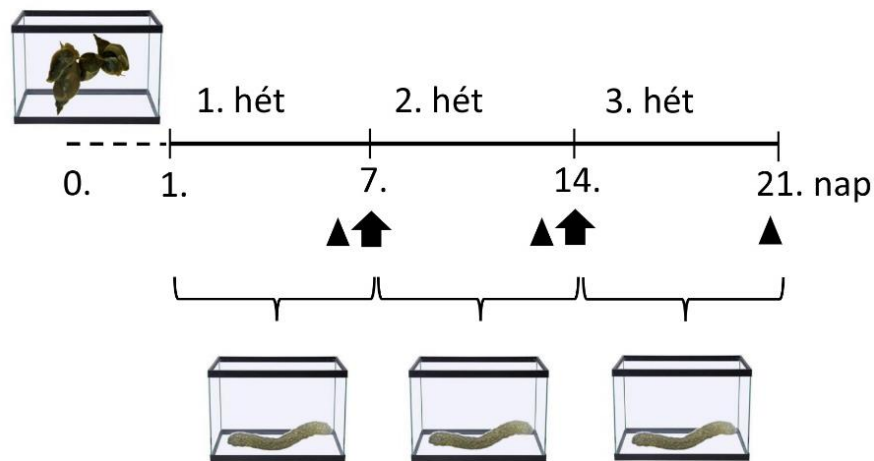
A bodorkákat a Balaton vízgyűjtő területéhez tartozó Sárvíz patakából (N46.91266 E16.87705) gyűjtöttük 2014 márciusában (gyűjtési engedély száma: VE-I-001/01890-9/2013). A munkacsoport egy korábbi felmérése alapján [53] valószínűsítettük, hogy az innen befogott halak nem voltak kitéve korábbi progesztogén expozíciónak. Ezt követően Tihanyban az MTA ÖK BLI állatkísérleti laboratóriumában tartottuk és kezeltük őket (tartási engedély száma: VE-I-001/01890-3/2013). Az egy hónapos akklimatizációs időszak alatt a halakat (n=90, súly: 18,5±4,5 g, hossz: 95,0±7,3mm) 20 °C-os, mesterséges Balaton-vízben tartottuk 200 literes tankokban, 12 órás fény-sötét ciklusban. Egy héten háromszor zöltség-alapú haleledelt (TETRA Werke) kaptak. A halakon végzett minden kísérletet az MTA ÖK Balatoni Limnológiai Intézet Munkahelyi Állatjóléti Bizottsága által kidolgozott és engedélyezett eljárások szerint végeztünk (VE-I-001/01890-10/2013), törekedve arra, hogy minimálisra csökkentsük az állatok szenvedését.

4.2 Kémiai anyagok és kezelés

Az állatok kezeléséhez HPLC tisztaságú PRG (P0130), LNG (L0551000), DRO (SML0147) és GES (L0551000) gyógyszergyári hatóanyagokat használtunk (Sigma-Aldrich). A hormon hatóanyagokat 0,5 M-os ciklodextrinben (H-107, 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin, Sigma Aldrich) oldottuk. A ciklodextrineket (ciklikus oligoszacharidok) jellemzően lipofil (hidrofób fizikai tulajdonságokkal rendelkező) vegyületek vizes oldatba vitelére használják. Ezt a tulajdonságát több területen is kihasználják, például a gyógyszergyártásban (hatóanyag kötése, felszívódás segítése, gyógyszer formulálás), vagy a környezetvédelemben (káros anyagok megkötése). Egéren és nyúlón végzett kísérletek alapján a szervezetre kifejtett káros mellékhatását nem figyelték meg. A kezelt csoportok hormon koncentrációinak ellenőrzéséhez minden héten mintát vettünk az akváriumi vizekből az aktuális vízcsere előtt és nagy hatékonyságú folyadékkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometria segítségével visszamértük a PRG, LNG, DRO és GES koncentrációt. Az adatok minden esetben 80% fölötti értéket mutattak a nominális koncentrációkhoz viszonyítva. Ezekre az adatokra alapozva az akváriumok vizeit hetente egyszer cseréltük, újratekerve a megfelelő koncentrációkkal az adott csoportokat. Az LC-MS minőségű metanolt, acetonitrilt és vizet a VWR International Kft-től szereztük be.

4.2.1 A nagy mocsári csiga progesztogén kezelése

A saját tenyészetből származó csigákat egy nap akklimatizáció után két csoportra osztottuk: kontroll (0,83 μ M ciklodextrin) és kezelt (keverékben alkalmazott PRG, DRO, LNG és GES, mindegyikből 10 ng/L) csoport. Az állatokat 21 napig kezeltük, 5 független kísérletben (tankonként 11 állatot 3 L vízben, összesen 55 állatot csoportonként) (**6. ábra**).



6. ábra A kísérleti elrendezés, a vízcserek és a mintagyűjtések időzítése. A csigákat egy napig akklimatizáltuk minden tankban kémiai anyagok nélkül (szaggatott vonal). A kísérlet kezdetén (1. nap) alkalmaztunk kezelést (ciklodextrin a kontroll csoportban, hormonok a kezelt csoportban). A 7., 14. és 21. napon a hormon tartalom visszamérést (▲), míg a 7. és 14. napokon teljes vízcsert végeztünk minden tankban (⬆).

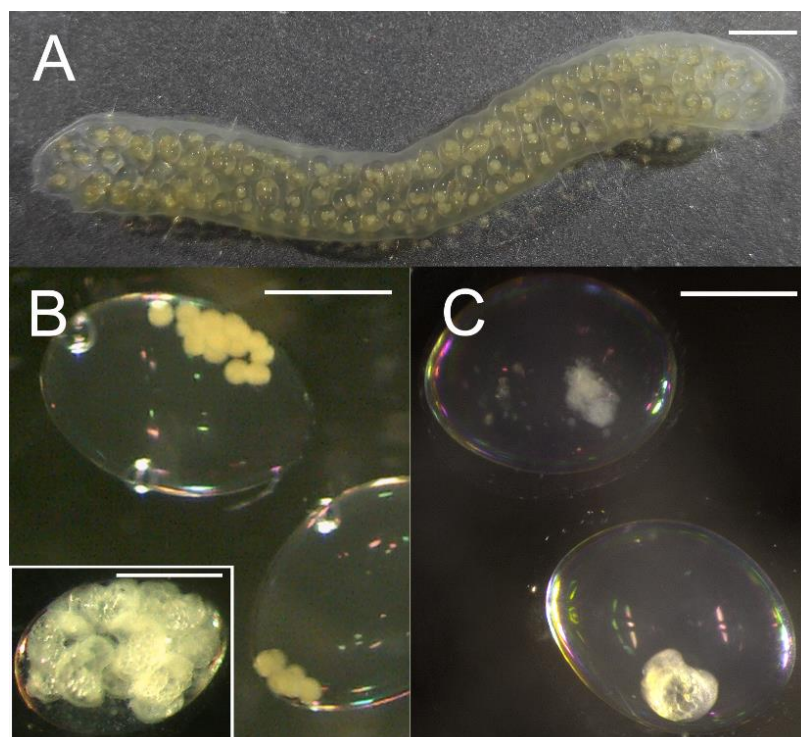
4.2.2 A bodorka progesztogén kezelése

A begyűjtött egészséges, kevert ivarú bodorkákat az egy hónapos akklimatizációs periódus végén négy csoportra osztottuk ($n=10$ állat csoportonként, 60 liter vízben): kontroll (amely csoport csak $0,83 \mu\text{M}$ ciklodextrint kapott), valamint progesztogén keverékkel (PRG, LNG és DRO, mindegyikből 10, 50 és 500 ng/L) kezelt csoportok. A halakat 42 napon át kezeltük. Metodikai kontroll céljából minden csoportot két párhuzamos kísérletben vizsgáltunk. Mivel a párhuzamos kísérletek eredményeiben nem találtunk különbséget, ezért azokat a továbbiakban együtt értékeltük ($n=20$ állat összesen, csoportonként). Az akváriumok vízminőségét hetente kétszer ellenőriztük, melynek során a következő átlag $\pm$ szórás értékeket kaptuk: hőmérséklet $20,3 \pm 2,4 \text{ }^\circ\text{C}$; $\text{pH}=7,8 \pm 0,2$; oldott oxigén $90,4 \pm 5,5 \%$; vezetőképesség $748,4 \pm 19,5 \mu\text{S}$. A csoportokban az egyedek hosszát és súlyát mértük a kísérlet kezdetén és végén. A 42 napos kezelési periódus végén a halakat szegfűszeg olajjal elaltattuk, majd dekapitáltuk. Agyukat, veséjüket, májukat és a gonádokat kipreparáltuk, majd súlyukat lemértük. A mintafeldolgozás ideje alatt jégen tartottuk a szerveket, minimalizálva az enzimatis reakciókat. A szomatikus indexeket a következők szerint számoltuk: $[\text{szöveti súly}/\text{testsúly}] \times 100$. A vizsgált szövetmintákat mindig ugyanabban az időben vettük, annak érdekében, hogy minimálisra csökkentsük

az olyan lehetséges befolyásoló faktorokat, mint a diurnális ritmus és a fényperiódus, melyek befolyásolják a redox-státuszhoz kapcsolódó folyamatokat. A szerveket a további felhasználásig szárazon -80 °C-on tároltuk, vagy egy éjszakán át PFA-ban (4%, PB-ben) fixáltuk, majd azidos PBS-ben tároltuk.

4.3 A petezsákok minőség értékelő rendszere

A felnőtt csigák által rakott petezsákokat (7. *ábra*) naponta gyűjtöttük mind a kontroll, mind a 10 ng/L kezelt csoportokból. Mivel nem az utódok hormonkezelése volt a cél, azokat hormon mentes vízben neveltük tovább.



7. *ábra* (A) *L. stagnalis* ~100 db, ≥ 96 órás tojást tartalmazó petezsákja. Méretskála: 3mm. (B) ~24 órás poliembrióniás tojások. A betét-kép ezeket a poliembrióniás tojásokat jeleníti meg az embrionális fejlődés felénél, ~96 órában. (C) Színtelen, nem pigmentált halott (felső) és élő (alsó) embrió megjelenésének összehasonlítása 96 órás tojásokban. Méretskála 500 μ m (B, C).

Egy általunk felépített értékelési rendszerben (3. *táblázat*) becsültük meg a petezsákok minőségét. Ez az egyszerű értékelési rendszer a statisztikában általánosan elfogadott 5%-os döntési szinten alapul és két szempontot értékel: a tojások poliembrióniája (több, mint egy zigóta egy tojáson belül – 7. *ábra*) és halott embriók (mozdulatlan, színtelen – 7. *ábra*) aránya a petezsák teljes tojás számához viszonyítva. A poliembrióniát a petezsák lerakásakor az első napon értékeltük, a halott embriók

számát pedig a negyedik napon határoztuk meg. Mindkét paramétert a következő szempontrendszerben értékeltük: nem megfigyelhető; 5% alatt megfigyelhető; 5% felett megfigyelhető. A paramétereket kombinálva a petezsák minőségét egy háromrészes értékelési rendszerben írtuk le: I – kiváló; II – közepes; III – rossz minőség.

3. táblázat Három részes petezsák értékelési rendszer. I. – kiváló (fehér cella); II. – közepes (világos szürk cella); III. – rossz (sötét szürk cella).

		A petezsák minősége		
Poliembríónia	≥5%	KÖZEPES	ROSSZ	ROSSZ
	<5%	KIVÁLÓ	KÖZEPES	ROSSZ
	0	KIVÁLÓ	KIVÁLÓ	KÖZEPES
		0	<5%	>5%
		Halott embriók		

Ezen kívül az értékelésnél figyeltük a tojások petezsák mérethez viszonyított számát, a túl sok kocsonyás anyag, vagy tojáson kívüli petesejtek, petesejt nélküli tojások jelenlétét, ugyanis ezek a jelenségek a csigák sérült reprodukciójára utalhatnak. Ezek együttes megjelenését poliembríóniával, vagy halott embriókkal lehetséges kizárási kritériumként vettük figyelembe. A kísérleti periódusban az egészséges, 3-6 hónapos felnőtt csigáktól származó petezsákoknál egyik fent említett jelenséget sem tapasztaltuk, így nem volt a kísérletből kizárt petezsák.

4.4 Az embrionális fejlődés korai szakaszának vizsgálata

Az embrionális fejlődés első három sejtosztódásának időablakát követtük végig, az embrió 8 sejtes állapotáig. Megfigyeléseinkhez egy idő-követésre képes LAS V4.5 programmal vezérelt Leica M205c sztereomikroszkópot és egy DFC3000G digitális kamerát használtunk. A három hetes kezelési periódust követően frissen lerakott petezsákokat egy szilikon-géllel kiöntött petricsészében tüvel rögzítettük és a zigótákat 10 percenként fotóztuk az 1 sejtes állapottól a 8 sejtes állapotig. Az időablak kezdetének az első sejtosztódás idejét jelöltük ki (a 2 sejtes állapot kezdete), az utolsó megfigyelési pont pedig a harmadik sejtosztódás ideje volt (a 8 sejtes állapot kezdete).

4.5 Vitellogenin ELISA

Mind a gerinces, mind a gerinctelen tesztállataink esetében mértük az egyes szervek VTG tartalmát. A csigák esetében a 21 napos, a halak esetében a 42 napos

kezelések végén preparáltuk, majd homogenizáltuk (jéghideg 0,2 M-os PBS-ben, pH=7,4, 10 mg szövet 100 µl-ben) a középbél mirigyét (hepatopancreas, n=6 csoportonként), illetve a nőstény halak májszövetét (n=3 csoportonként). A homogenizátumokat további sejtfeltárás céljából szonikáltuk jégen 20 percig, majd 15 percig centrifugáltuk (1500 × g). A VTG tartalmat a felülúszóból határoztuk meg ELISA kit segítségével (MBS010726, MyBioSource, szenzitivitás 5,0 ng/mL; lineáris tartomány: 31,2-1000 ng/mL). A kalibrációs mintahelyekhez VTG standard hígítási sort adtunk (31,2; 62,5; 125; 250; 500; 1000 ng/mL), a teszt mintahelyekhez a középbél mirigy és máj mintákat (50 µl). Ezután 100 µl HRP-t adtunk minden mintahelyhez, majd inkubáltuk 1 órát 37 °C-on. Mosás után a mintahelyekhez az enzimatisz színreakció kifejlődése céljából színeképző oldatot adtunk (kromogén reagens A és B, 1:1), majd 15 percet inkubáltuk 37 °C-on. Ezt követően leállítottuk az enzimreakciót 50 µl tömény (2N) kénsavval, a kifejlődött színreakció intenzitását pedig ELISA-lemez leolvasóval (Victor3 1420 több csatornás számláló, PerkinElmer) mértük 450 nm-es hullámhosszon. Végül a hepatopancreas és a máj VTG tartalmát szöveti koncentrációra (ng/mg szövet) átszámítottuk.

4.6 DJ-1 ELISA

A bodorkák agyából és májából, valamint a csigák agyából és középbél mirigyéből szendvics ELISA technikával (DuoSet ELISA Kit-R&D systems, RD-DY8136-05) kvantitatív DJ-1 fehérje meghatározást végeztünk az előírt protokoll szerint. Ehhez a kontroll és a 10, 50, 500 ng/L kezelt csoportok egyedeinek agy és máj szöveteit (n=6 csoportonként) PBS-ben (pH=7,3) homogenizáltuk, majd a szöveti törmelékét 15 percen át 1500 x g-n lecentrifugáltuk. A tiszta felülúszóból határoztuk meg a DJ-1 mennyiségét. Első lépésben a mintahelyekre kikötöttük a DJ-1 specifikus elsődleges antitestet (#844090) 0,8 µg/mL mennyiségben. A mintahelyeket mosást követően szobahőmérsékleten 1 órán át blokkoltuk. Ezután 100 µl DJ-1 standard (#844092) hígítási sort (0,313; 0,625; 1,25; 2,5; 5 ng/mL) és 100 µl szövetmintát adtunk a megfelelő mintahelyekhez és 1 órát inkubáltuk azokat szobahőmérsékleten. A mintákhoz hígító oldatban (1% BSA PBS-ben, pH=7,3) 45 ng/mL koncentrációban feloldott másodlagos antitestet (#844091) adtunk, majd további 2 órán át inkubáltunk szobahőmérsékleten. Mosást követően hígító oldatban oldott streptavidin-HRP-t (1:40) adtunk a mintahelyekhez és további 20 percet inkubáltunk sötétben. Az enzimreakciót TMB (3,3',5,5'-Tetramethyl-benzidine; #T0440; Sigma Aldrich) előhívó oldattal

intenzifikáltuk. 20 perc sötétben való előhívást követően a reakciót tömény kénsavval (2N) állítottuk le, majd az immunkomplex jelenlétére utaló kialakult kék szín optikai denzitását ELSIA-lemez leolvasóval (Victor3 1420 több csatornás számláló, PerkinElmer) mértük 450 nm hullámhosszon. A mérést hármasként elrendezésben végeztük, korrekciós háttérkivonással (550 nm), végül a minták DJ-1 tartalmát szöveti koncentrációra (ng/mg szövet) átszámítottuk.

4.7 Immunhisztokémia

4.7.1 GnRH-szerű fehérjék vizualizálása

A PFA-ban (4%, PB-ben) fixált csiga agy szöveteket mosást követően 20%-os glükóz oldattal 4 órán át telítettük mind a kontroll, mind a 10 ng/L kezelt csoportok esetében (n=8 csoportonként). A fixált szövetekből, kriosztáttal 14 µm-es metszeteket készítettünk, majd azokat mikroszkóp tárgylemezre vettük fel. PBS-ben történő mosás után, a metszeteket 0,25% BSA, Triton X-100 (PBS-ben) oldatban blokkoltuk 1 órán keresztül, majd 1 µg/mL (1:200 hígítás) nyúlban termeltetett anti-humán GnRH antitesttel (HPA027532, Sigma) borítottuk azokat 24 órán át, 4 °C-on. Mosást követően, NorthernLights™ NL557-konjugált számar anti-nyúl másodlagos antitesttel (NL004, R&D Systems) kezeltük a metszeteket (16 óra, 4 °C, 1:200-as hígítás), majd 1 µg/mL Hoechst 33342-vel (62249, Thermo Scientific) magfestést végeztünk szobahőmérsékleten, 15 percig, sötétben. A metszeteket PBS-glicerín 1:1 arányú oldatával fedtük. Kísérleteinkben preabszorpciós kontroll vizsgálatot (anti-GnRH – GnRH1 standard 1:1) és metodikai kontroll vizsgálatot (elsődleges antitest kihagyása) is végeztünk. A kontroll vizsgálatok esetében immunpozitív jelet nem figyeltünk meg a szövetekben. Az immunreakciót Leica DMI8 lézer konfokális mikroszkóppal és LASX (Leica Microsystems) szoftverrel elemeztük.

4.7.2 DJ-1 szerű fehérje vizualizálása

A PFA-ban (4%, PB-ben) fixált hal agy és máj szöveteket mosást követően 20%-os glükóz oldattal 12 órán át telítettük, majd a szövetekből PBS-ben történő mosás után kriosztáttal 12-14 µm-es metszeteket készítettünk, melyeket polilizinnel borított tárgylemezre vettünk fel. A metszeteket 0,25% BSA, Triton X-100 (PBS-ben) blokkolási lépés után egér anti-PARK7/DJ1 biotinilált elsődleges antitesttel (0,45 µg/mL, 1:6 hígítás, katalógus szám: 844091, R&D Systems) inkubáltuk egész éjjel, 4 °C-on. Ezt követően, PBS-ben mostuk őket, majd avidin-konjugált Alexa488 festékkel (NL009, R&D Systems) inkubáltuk 1:1000 hígításban, 2 órán át 4 °C-on. A módosított

DPBS-sel (8 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, 140 mM NaCl, 10 mM KCl, pH=7,4) történő mosást követően jelöltük a sejtmagokat Hoechst 33342 festékkel (1 µg/mL, DPBS-sel hígítva), 10 percig szobahőmérsékleten, sötétben. DPBS-sel történő mosást követően PBS-glicerin 1:1 arányú oldatával fedtük a metszeteket, majd Leica DMI8 lézer konfokális mikroszkóppal és LASX (Leica Microsystems) szoftverrel analizáltuk.

4.8 Áramlási citometria

A csigák spermium számának meghatározásához a három hetes kezelési periódus utolsó 4 napján izoláltuk egymástól a felnőtt állatokat (kontroll n=14 és kezelt n=12) [125]. A kísérleti periódus végén a csigákat 2 ml 50 mM MgCl₂-dal szedáltuk, preparáltuk a középbél mirigy proximális felén futó ondóvezetékét a mirigyet borító hártýából való kilépéstől a prosztatába (a vékonyabb, hermafrodita vezetékig) futó szakasz mentén (**2. ábra**). A *L. stagnalis* reprodukciós rendszerének ezen részén az ovotestisben (módosult ivarmirigy, amely az ovárium és a here megfelelője) megérő petesejtek ugyan áthaladnak, de nem raktározódnak. A csigák 4 napos izolálása azért szükséges, mert ez idő alatt kiürül a hermafrodita vezeték, a kanyarulat csatorna (*pars contorta*) és a tojástok (*ootheca*), valamint aktiválódik, dominánssá válik a hím reprodukciós rendszer és az ondóvezeték megtelik érett, elraktározott spermiumokkal [125]. A preparált ondóvezetékét sóoldatba (50 mM NaCl, 2 mM KCl, 4 mM CaCl₂, 4 mM MgCl₂, 10 mM TRIS, pH=7,06) tettük, vortex-szel alaposan kevertük, majd a visszamaradó szövetdarabot csipesszel eltávolítottuk. Az oldatban maradó spermiumokat 100 nM MitoTracker® Deep Red FM (Life Technologies, CA, USA) festékkel jelöltük, mely csak működő mitokondriumokat jelöl. Inkubálás (30 perc, szobahőmérsékleten, sötétben) és centrifugálás (1500 × g, 20 °C) után a pelletet kétszer mostuk sóoldatban. A második mosás után már 1 mL PFA-ban (4%, PB-ben) vettük fel a spermiumokat, vortex-szel kevertük, majd 4 órán át fixáltuk szobahőmérsékleten sötétben, végül mosás következett. A mosás után már 1 mL DPBS-ben hígítottuk a spermiumokat és 1 µg/mL Hoechst 33342 festékkel (Life Technologies, CA, USA) jelöltük a sejtmagokat (inkubálás 15 percig sötétben, szobahőmérsékleten). Az áramlási citometriás vizsgálatokhoz minden mintából készítettünk 10x, 100x és 200x hígítást. A spermiumszámot Partec CyFlow ML áramlási citométerrel mértük, melynek során Partec FloMax® FCM Data Acquisition and Analysis szoftvert használtunk. Részecske válogatás (sorter) után Leica DMI8 lézer konfokális

mikroszkóppal ellenőriztük az analizált felhő tartalmát. Minden hígítást ismétléssel mértünk, az eredményt a hígítás fokával korrigáltuk.

4.9 Kapilláris mikromintavételi technika

Az instabil metabolitok mérése szenzitív és megbízható mérési módszert igényel, gyors átfutási idővel. A kapilláris mikromintavételi technikával kombinált tömegspektrometria magas szenzitivitása és specificitása miatt egy gyors és alkalmas eszköz a molekulák (metabolitok, lipidek, peptidek) feltérképező jellegű, kvalitatív analízisére [134,135,137]. A tojásból történt egy-sejt metabolomikai vizsgálatokhoz (embrió és szikanyag) kapilláris mikro-mintavételi technikát alkalmaztunk Zhang [135] munkája alapján. A harmadik kezelési hét végén az egy-sejt analízisre vett mintáink olyan petezsákokból származtak, amelyek kiváló minősítést kaptak az értékelés során. A csiga áttetsző tojásai ellipszis alakúak, 1 mm átmérőjűek, egyenként ~0,5 μL viszkozus szikanyagot tartalmaznak. A vizsgálathoz a tojásokat kivettük a petezsákból és a petezsák kocsonyás anyagát egy nedves, szálmentes kendővel eltávolítottuk a tojások felszínéről. A tojásokat egy Petri-csészébe helyeztük, melyeket megtámasztottunk egy üveglemezzel, a mintavételi oldallal szemben. Egy mintavételi kapillárisal (TW100-F-3, World Precision Instruments, Sarasota, FL) mikromanipulátor segítségével (Micromanipulator 5171, Eppendorf Austria GmbH., Bécs, Ausztria) ~0,3 μL szikanyagot vettünk mind a kontroll, mind a 10 ng/L kezelt állatok tojásaiból (n=12 csoportonként), majd azok metabolit összetételét MS-el vizsgáltuk. Az egy-sejtes állapotú zigóta ~100-120 μm átmérőjű, gömb alakú sejt, a peterakást követően már egy órán belül kettéosztódik. A fertilizáció a petesejten és a tojáson látható jelek alapján megállapítható (poláris test – érett petesejt, ami keresztül ment a második meiózison; spermium flagellum maradványok a tojás szikanyagában a mikroszkópos képen). Így az embrió egy-sejt analízis csak bizonyítottan megtermékenyített petesejtből történt. A citoplazma mintavétel során egy polírozott hegyű, ~20 μm végátmérőjű (~0,5-1 M Ω ellenállású) rögzítő kapillárist és egy röviden elvékonyodó (short tapering) ~1 μm végátmérőjű (2-3 M Ω ellenállású) mintavételi kapillárist (BF100-50-10, Sutter Instrument, Egyesült Államok) használtunk. Mikromanipulátor és vákuum segítségével rögzítettük az egy-sejtes zigótát a rögzítő kapillárisal és ~0,5 nL térfogatú mintát vettünk (n=10 csoportonként) az ellentétes oldalról egy másik manipulátorba befogott mintavételi kapilláris segítségével. A citoplazma metabolit összetételét szintén MS-el vizsgáltuk.

4.10 Tömegspektrometria

4.10.1 Off-line NanoElectrospray IMS TOF tömegspektrométer

A csiga tojásban a szikanyag vagy citoplazma metabolit összetételének meghatározását ion mobilitás analizátorral (IMS) is felszerelt repülési idő (TOF) analizátoros tömegspektrométerrel (Synapt G2-S, Waters Co., Milford, MA) végeztük. A mintavétel után a mintavételi kapillárisba 1 μ L elektrospré oldatot töltöttünk (50 és 10% metanol) gél töltő pipetta hegy segítségével (930001007, Eppendorf, Hauppauge, NY). A kapillárist óvatos rázással buborék-mentesítettük, mielőtt csatlakoztattuk a kapilláris befogóba. A kapilláris befogó egy módosított, mozgatható és szigetelt hordozóba volt rögzítve (H-12-S, Narishige, Tokyo, Japan). A kapilláris végétől egy $\sim 1,5$ cm hosszú platina szálát vezettünk be, úgy, hogy a kapillárisban lévő folyadékszintet elérje. A kapillárist úgy helyeztük el, hogy annak hegye a nagy felbontóképességű ($\sim 10\,000$ FWHM) tömegspektrométer bemenetétől (oriface) kb. 5 mm-re, középen helyezkedjen el. A platina szálra 200 V feszültséget kapcsoltunk egy külső tápegység segítségével, a megfelelő elektrospré előállításához és a vizsgálni kívánt molekulák ionizálásához. A keletkezett ionok kezdetben az IMS rendszerbe kerültek, amely sodró (drift) gáz segítségével választotta szét a hullámmozgást végző ionokat, a molekulák alakja vagy ütközési keresztmetszete szerint (collision cross section). Ezután a már szétválasztott ionok (és szétválasztott izobár tömegek) kerültek a repülési idő analizátorba tömeganalízisre. Az IMS rendszerben nitrogén gázt alkalmaztunk sodró gázként 90 mL/perc-es áramlási sebességgel, 3,25 mbar nyomáson. Az IMS rendszerben a hullámsebességet 650 m/s-ra, míg a hullámmagasságot 40 V-ra optimalizáltuk. Az analízis során az ionok sodródási idejét (drift time) és m/z értékét rögzítettük. Az egy-sejt minták spektrumai 3 adatgyűjtés (scan) átlagából készültek (1 adatgyűjtés/s). Szerkezet-meghatározást argon ütközési gáz segítette fragmentációval végeztünk (CID), 20-30 eV energia alkalmazása mellett.

4.10.2 Off-line NanoElectrospray ion csapda tömegspektrométer

A tojásban a szikanyag vagy citoplazma metabolit összetételének meghatározását Off-line NanoElectrospray ionforással (73084, Bruker Daltonics, Bréma, Németország) felszerelt Bruker AmaZon SL (Bruker Daltonics, Bréma, Németország) ion csapda analizátoros tömegspektrométerrel szintén elvégeztük. A

mintával és elektrospné oldattal (1 µl) utántöltött kapillárist buborék-mentesítettük, majd a kapilláris befogóba rögzítettük. Ezután, a kapilláris befogót az Off-line NanoElectrospray ionforrásban rögzítettük a hordozó (Mounting tool) segítségével. A hordozót eltávolítottuk a befogóról, majd bezártuk az ionforrást. A minta kapillárist pozícionáltuk x-, y-, z-irányokban a manipulátorok segítségével, úgy, hogy a kapilláris hegye kb. 5 mm-re legyen a tömegspektrométer bemenetétől. A folyamatot két kamera segítségével követtük nyomon. Az ionforrást negatív ionizációs módban használtuk, 950 V ionizáló feszültséget (On Volt) alkalmazva. A következő elektrospné paramétereket állandó értéken tartottuk az analízis ideje alatt: szárító gáz (N₂) sebessége 4 L/min, hőmérséklete 120 °C, vivőgáz nyomása 3 psi. A mérés során az ion csapda feltöltési szakaszában 20 ms-s várakozási időt (Pre-time) alkalmaztunk, annak érdekében, hogy biztosítsuk a stabil ionáramlást. A csapdázási irányt (Trap drive) 55 V-ra állítottuk. Az ionforrást pulzáló módban alkalmaztuk a molekulák azonosításához. Az ionizáló feszültséget (On Volt) 950 V-ra állítottuk, míg a maradék feszültséget (Rest Volt Offset) - 250 V-ra, így az abszolút alkalmazott feszültség (Rest Volt) 700 V volt. A pulzáló mód alkalmazásával csökkenthető az alkalmazott sprézfeszültség értéke a feltöltési időszakon kívül. A feltöltési időszakban a sprézfeszültség megegyezik az ionizáló feszültséggel (On Volt), míg a feltöltési időszakon kívül a sprézfeszültség az abszolút feszültségre (Rest Volt) csökken (ionizáló feszültség + maradék feszültség; On Volt + Rest Volt Offset). A pulzáló mód alkalmazása két előnnyel jár: lágyabb ionizációt biztosít, így védi a mintát az analízis ideje alatt, valamint néhány anyag így stabilabb az ion-sprében. Azonban, van egy hátránya is: az aktuális ion-áram nem állapítható meg. A fragmentációhoz a legintenzívebb 5 anyaiion került automatikusan kiválasztásra, aktív anyaiion kizárást alkalmaztunk háromszori fragmentálás, valamint 1 perc után. MS/MS fragmentációs amplitúdónak 2 V-t alkalmaztunk.

4.11 Adatemelzés

Az adatelemzést és a spektrum kiértékelést Mass Lynx V4.1 (Waters Inc.), valamint Bruker DataAnalysis 4.1 (Verziószám: 359) szoftverekkel végeztük. A molekulák azonosítása egyrészt normál tömegspektrumból történt <5 ppm tömegpontossággal és/vagy a mért CCS adatok valamint az irodalmi referencia CCS adatok összevetésével, másrészt egyes metabolitok esetén MS/MS spektrumból a fragmentációs profilok segítségével. A metabolit arányok meghatározását Graef [136]

valamint Zhang és Vértés [137] által leírtak szerint hajtottuk végre. Az egy-sejtes zigótákban meghatároztuk az adenilát energia-hordozók (AEC) relatív arányát és a hexózok (pl. glükóz, galaktóz stb.) felhasználást a következő egyenletek szerint:

$$AEC = \frac{ATP + 0.5 ADP}{ATP + ADP + AMP} \qquad \text{hexóz felhasználás} = \frac{UDP\text{hex}N\text{Ac}}{UDP\text{hex}}$$

A szikanyagban az AEC mellett a redox státuszt is meghatároztuk, melyet a NADH (664,11 *m/z*) és NAD⁺ (662,10 *m/z*) molekulák arányából számítottuk de Graef, valamint Obrosova nyomán [136,138].

$$\text{redox státusz} = \frac{NADH}{NAD^+}$$

4.12 Szérum koleszterin, LDL-, HDL-koleszterin és triglicerid mérés

Az elkábított halaktól 1 mL vért vettünk zárt vérvételi rendszer segítségével (véralvadásgátló nélkül) a kontrol és az 500 ng/L kezelt csoport állataitól egyaránt (n=4 csoportonként). A mintákat centrifugáltuk (10 perc, 20 °C, 1500 × g), majd a felülúszóból szabad koleszterint (CHOL), HDL-, LDL-koleszterint és triglicerideket (TG) mértünk automatizált enzimatikus és kolorimetriás eljárással (Roche Integra 800 System, La-Roche Ltd.). A mérések a rutin laboratóriumi eljárás szerint történtek a Pécsi Tudományegyetem Klinikai Központ Laboratóriumi Medicina Intézetében.

4.13 Stressz fehérjék vizsgálata

A 42 napos kísérleti periódus után a kontroll és 500 ng/L kezelt állatoktól nyert szérum mintákból (n=3 csoportonként) stressz fehérjék vizsgálatát végeztük el (Human Cell Stress Array Kit, R&D Systems). A mintákat PBS és proteáz inhibitor koktél (Sigma Aldrich) keverékével hígítottuk, majd 1% Triton X-100-at adtunk hozzájuk és centrifugáltuk (5 perc, 10 000 × g), hogy eltávolítsuk a sejtörmeléket. Teljes fehérje mennyiség mérést végeztünk a mintákból annak érdekében, hogy az összes mintából egyforma mennyiséget vigyünk fel az assay membránokra. A membránokat blokkoltuk 1 órán át, majd a másodlagos antitest koktéllal egy újabb órán át inkubáltuk szobahőmérsékleten. Az előkészítés után a membránokat 1 mL mintába merítettük és rázópadon, 2-8 °C-on, egész éjjel inkubáltuk. Háromszoros mosás után HRP-konjugált sztreptavidint adtunk minden membránhoz és kemilumineszcens detektáló oldattal (Amersham Biosciences, Hungary) előhívtuk. Az

előhívott filmet digitalizáltuk és a képpontok intenzitása alapján értékeltük az immunpozitív sávokat. A kiértékelést Fiji ImageJ szoftverrel végeztük, a sávok képpontjait a kontroll sávokhoz normalizáltuk és jelentősnek tekintettük a változást 35% feletti CV érték esetén.

4.14 Statisztikai analízis

A statisztikai elemzést OriginPro® 2015 (OriginLab Corp., Northampton, Massachusetts, USA) és IBM SPSS Statistics Version 20 (IBM Magyarország Kft.) szoftverek segítségével végeztük. Az adatsorokon normalitás tesztet Kolmogorov-Smirnov próbával, a varianciák egyenlőségét Levene statisztikával ellenőriztük. Ezek eredménye alapján a következő adatsorok összehasonlításában alkalmaztunk független mintás t-próbát, egy-utas ANOVA-t (Welch korrekciót, Scheffe vagy Tamhane post hoc tesztet alkalmazva a releváns helyeken): a VTG meghatározás mindkét fajban, a petesejt termelés, az adenilát energia-töltést (AEC), a redox státusz meghatározása a nagy mocsári csigában, a DJ-1 fehérje mennyiség, koleszterin, HDL-, LDL-koleszterin és triglicerid meghatározása a bodorkában. A csiga petezsákok minőségének összehasonlítása, bodorkában a kezelés kezdetén és végén mért testhossz közti különbségek, a kezdeti- és végsúly közti különbségek meghatározása, a szomatikus indexek összehasonlítása az egyes kezelési csoportokban a nem-paraméteres Kruskal-Wallis tesztel történt. A különbségeket $P < 0,05$ érték esetén tekintettük szignifikánsnak.

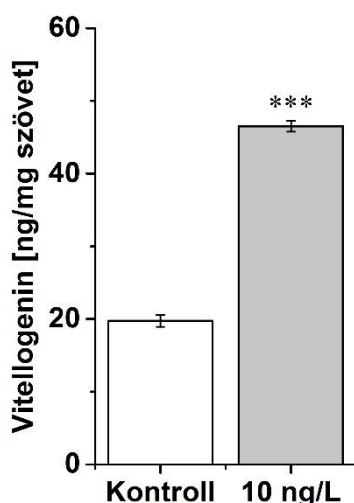
5 Eredmények

5.1 Progesztogének hatása a nagy mocsári csigában

5.1.1 Kvantitatív molekuláris változások

5.1.1.1 A középbél mirigy VTG tartalma

A felnőtt csigák középbél mirigyében szignifikánsan emelkedett a VTG-szerű fehérjék szintje a három hetes progesztogén kezelés végére. A kontroll csoportban $19,74 \pm 0,40$ ng/mg szövet volt a VTG-szerű fehérje koncentrációja, míg a 10 ng/L progesztogén kezelt csoportban ez szignifikánsan növekedett $46,51 \pm 0,35$ ng/mg szövet értékre (**8. ábra**). Ez a megfigyelés a magyarázata a később, a kezelés végén az állatokban megfigyelt, megemelkedett petesejt számnak (lásd 5.1.3.1 fejezet).

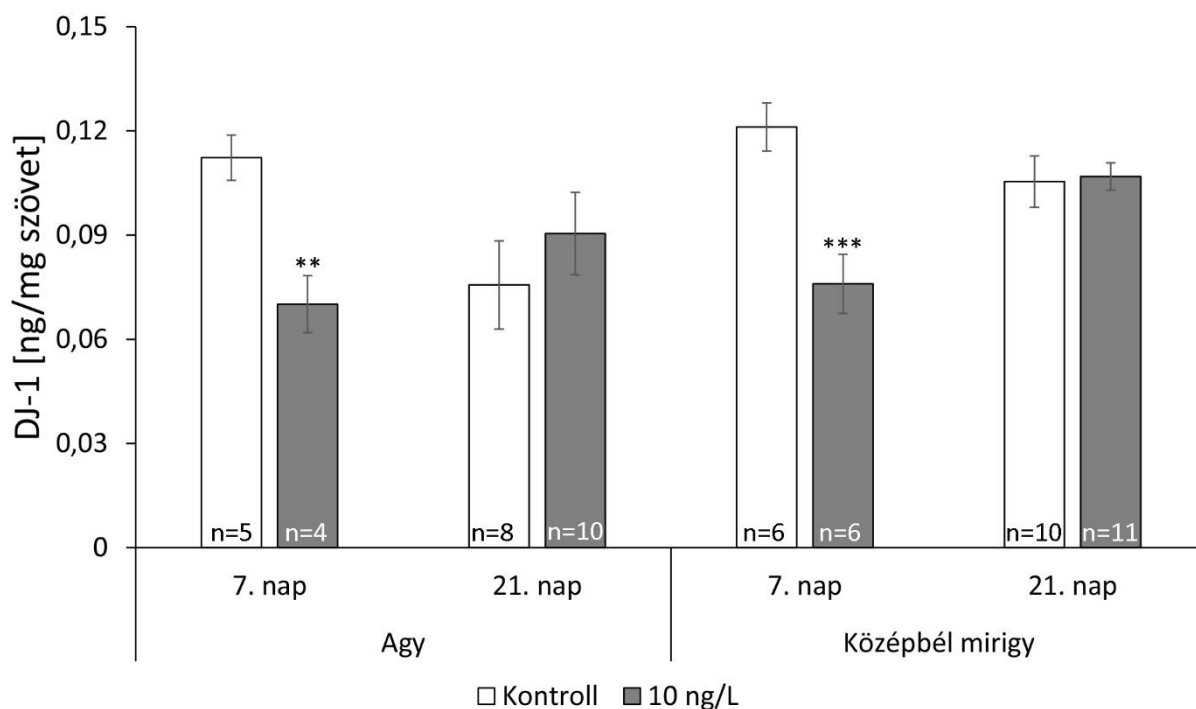


8. ábra A VTG-szerű fehérje mennyiségi változása progesztogén kezelés hatására felnőtt állatokban. A VTG mennyiségét a kísérlet végén ELISA technikával határoztuk meg a két kezelési csoportban ($n=6$ csoportonként, két független szériából). A VTG szint a 10 ng/L progesztogén kezelt csoportban (szürke oszlop) szignifikánsan emelkedett [$t_{(8)}=-54,79$; $P<0,001$] a kontroll csoporthoz képest (fehér oszlop). Csillaggal (***) jelöltük a szignifikáns ($P<0,001$) eltérést, a diagram hibasávjai az adatsor szórását jelzik.

5.1.1.2 DJ-1 fehérje mennyiségi viszonyai az agyban és a középbél mirigyben

Vizsgálva a DJ-1 védő fehérje mennyiségét azt találtuk, hogy a 7. napon mért eredmények a kontrollhoz képest szignifikáns különbséget mutattak a kezelt csoportban, mind az agy, mind a középbél mirigy minták esetében. Agyból a kontroll csoportban $0,112 \pm 0,006$ ng/mg szövet, a 10 ng/L kezelt csoportban pedig $0,070 \pm 0,008$ ng/mg szövet DJ-1 fehérje koncentrációt mértünk. A középbél mirigyben a kontrollban $0,121 \pm 0,006$ ng/mg szövet, a 10 ng/L kezelt csoportban $0,075 \pm 0,008$ ng/mg szövet volt a DJ-1 koncentráció. Ez a különbség azonban eltűnt a kezelés végére, a 21. napon jelentős különbség sem az agy (kontroll – $0,075 \pm 0,012$ ng/mg szövet; 10 ng/L kezelt – $0,090 \pm 0,011$ ng/mg szövet), sem a középbél mirigy (kontroll – $0,105 \pm 0,007$ ng/mg

szövet; 10 ng/L kezelt – $0,106 \pm 0,003$ ng/mg szövet) minták esetében nem volt detektálható (9. ábra).



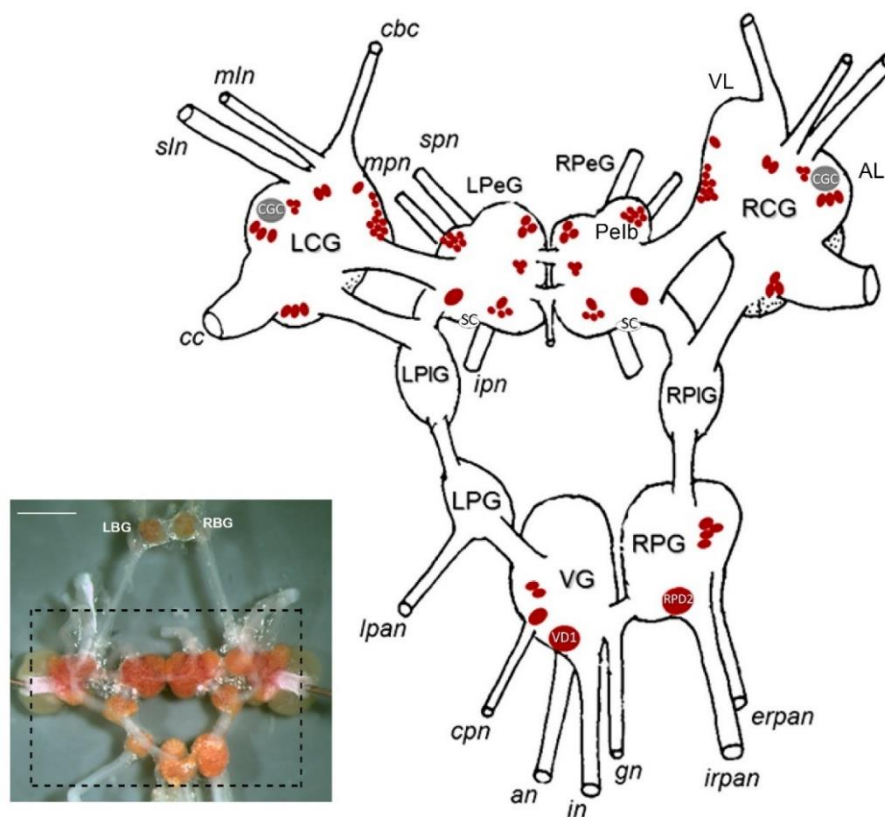
9. ábra Az agy és a középbél mirigy DJ-1 mennyisége a 21 napos kezelési periódus 7. és 21. napjain *Lymnaea*-ban, ELISA technikával meghatározva. A DJ-1 szint a 7. napon a 10 ng/L progesztogén kezelt csoportban (szürke oszlop) szignifikánsan csökkent [$t_{(7)agy}=4,321$; $P<0,01$; $t_{(7)középbél\ mirigy}=5,030$; $P<0,001$] a kontroll csoporthoz képest (fehér oszlop). Csillaggal (** és ***) jelöltük a szignifikáns ($P<0,01$ és $P<0,001$) eltérést, a diagram hibásávjai az adatsor szórását jelzik.

5.1.2 A hím reprodukciós rendszerben megfigyelt hatások

5.1.2.1 A GnRH-szerű fehérjék immunhisztokémiai feltérképezése a központi idegrendszerben

A *L. stagnalis* CNS-ében feltérképeztük a GnRH-szerű peptid immunopozitív sejtek eloszlását. A **10. ábra** ezen sejtek sematikus elrendeződését mutatja. Megfigyeltünk kicsi ($<50\ \mu\text{m}$), közepes ($50 - 100\ \mu\text{m}$) és óriás ($100 - 150\ \mu\text{m}$) méretű immunopozitív neuronokat, amelyek a L/RCG-ban, a LPeG-ben és a RPeG-ben, a RPG-ben és VG-ban helyezkedtek el. Ugyanezekben a ganglionokban a neuropil varikózus rostjai is mutattak immunreaktivitást. Nem-neuronális szövetekben (pl. kötőszövet, hártya borítás, erek) nem azonosítottunk GnRH-szerű peptideket expresszáló sejteket. Az óriás neuronok közül ki kell emelni a szív működés szabályozásában is szerepet játszó, elektromos és kémiai szinaptikus kapcsolatban álló viscerális-dorzális (VD1)

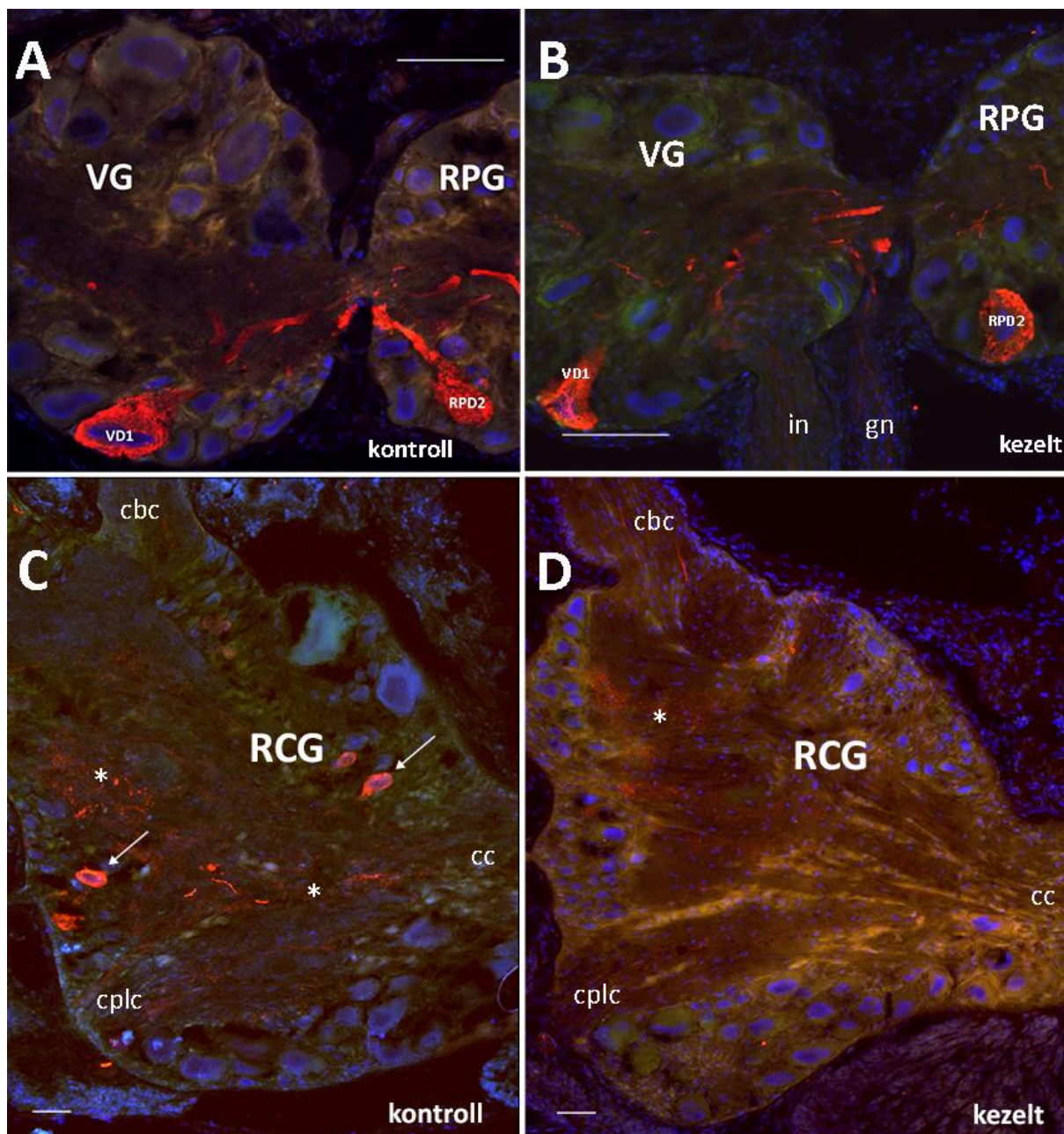
és a jobb parietális-dorzális (RPD2) óriásneuronokat és azok immunpozitív arborizációját a VG-ban és a RPG-ban (11. ábra A és B).



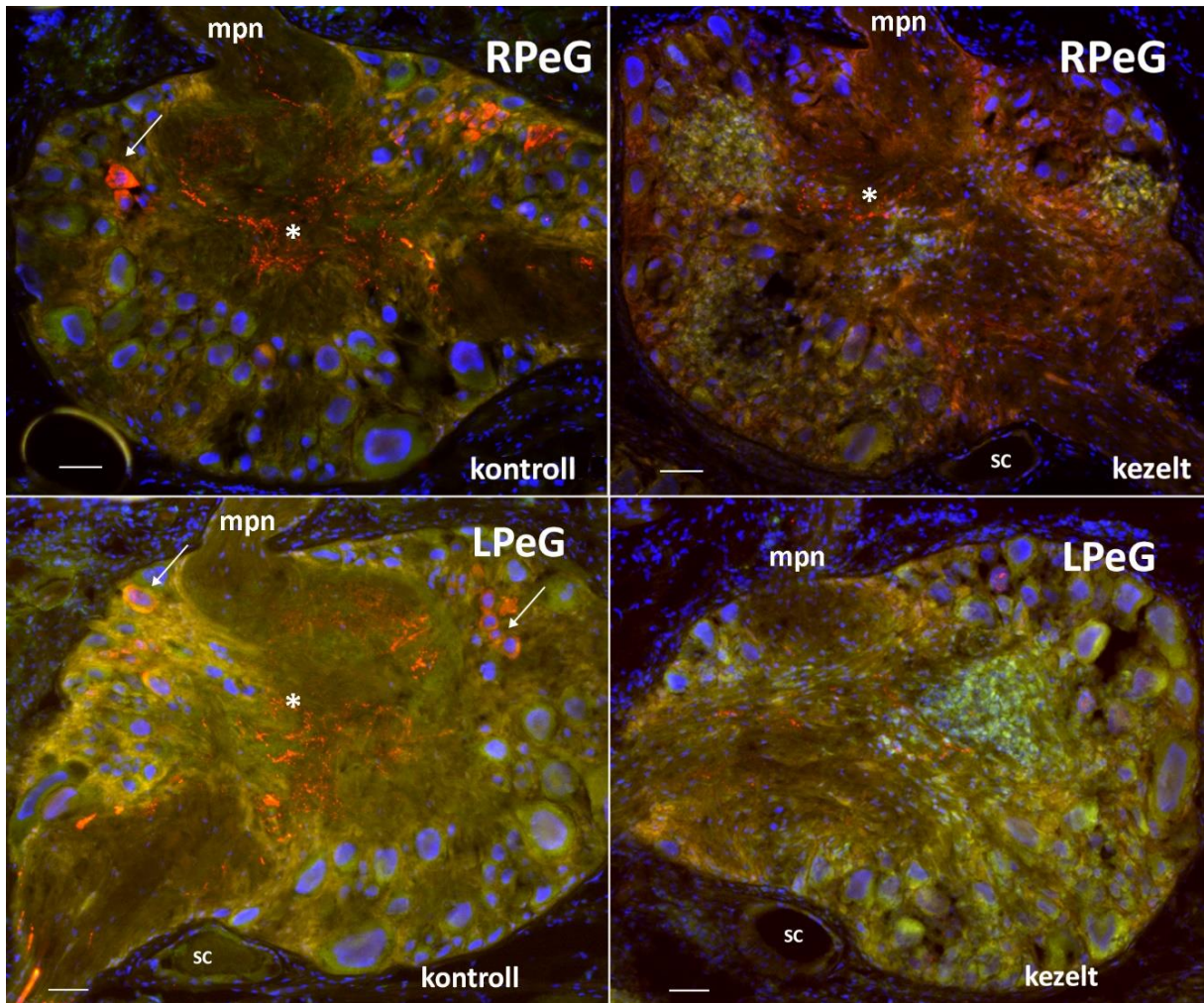
10. ábra *L. stagnalis* CNS-ének fénymikroszkópos képe (bal). Méretskála 2 mm. GnRH immunpozitív sejtek lokalizációjának sematikus megjelenítése a CNS-ben (jobb). Rövidítések: AL – elülső lebeny (anterior lobe); an – végbél ideg; cbc – agydúc-pofadúc konnektívum; cc – agydúcok közti kapcsolat; CGC – agyi óriás sejt; cpc – agydúc-lábdúc konnektívum; cplc – agydúc-falidúc konnektívum; cpn – bőr-agyköpeny ideg; erpan – külső jobb fali ideg; gn – ivarszervi ideg; in – bél ideg; ipn – alsó lábideg; irpan – belső jobb fali ideg; lpan – bal fali ideg; L/RBG – bal/jobbs pofadúc; L/RCG – bal/jobbs agydúc; L/RPeG – bal/jobbs lábdúc; L/RPG – bal/jobbs fali dúc; L/RPIG – bal/jobbs köpenydúc; mln – középső ajakideg; mpn – középső lábdúc; Pelb – lábdúc lb régiója; sc – statociszta; sln – felső ajakideg; spn – felső lábdúc; VG – zsigerigydúc; VL – hasi lebeny (ventral lobe).

Mindkét sejt a kontroll és a 10 ng/L progesztogén kezelt állatok CNS-ében egyaránt mutatott immunreaktivitást, közel azonos intenzitással. A jelölt neuronok vastag axonjai a neuropilbe vetültek, ott többszörösen elágaztak. A VG-ból az ivarszervi és bél idegen keresztül kifutó rostokat figyeltünk meg. A RCG jelölődésének intenzitásában már eltérés mutatkozott a kontroll és a kezelt csoport állatai között. A kontroll csoportban sejtek és neuropil egyaránt jelölődött, de a 10 ng/L progesztogén kezelés után a GnRH jelölődés intenzitása lecsökkent. A csökkenés

a kezelt csoportban az elülső lebeny (AL) sejtjeit is érintette, melyek a hím reprodukció szabályozásában vesznek részt. A **11C és D ábra** a RCG reprezentatív immunjelölését mutatja. A **12. ábra** a L/RPeG-ban megjelenő GnRH-immunpozitív sejteket és a neuropil jelölődést mutatja. A kontroll csoportban (A és C) a L/RPeG egyaránt tartalmazott nem azonosított kicsi- és közepes méretű immunpozitív sejteket, de a 10 ng/L progesztogén kezelésben (B és D) sejtek nem, csak a neuropil mutatott immunreakciót a megjelenített, közel azonos metszési síkokban. A csökkenés a kezelt csoportban a hím reprodukcióért felelős, RPeG-ban található PeIb klaszter sejtjeit (**10. ábra**) is érintette.



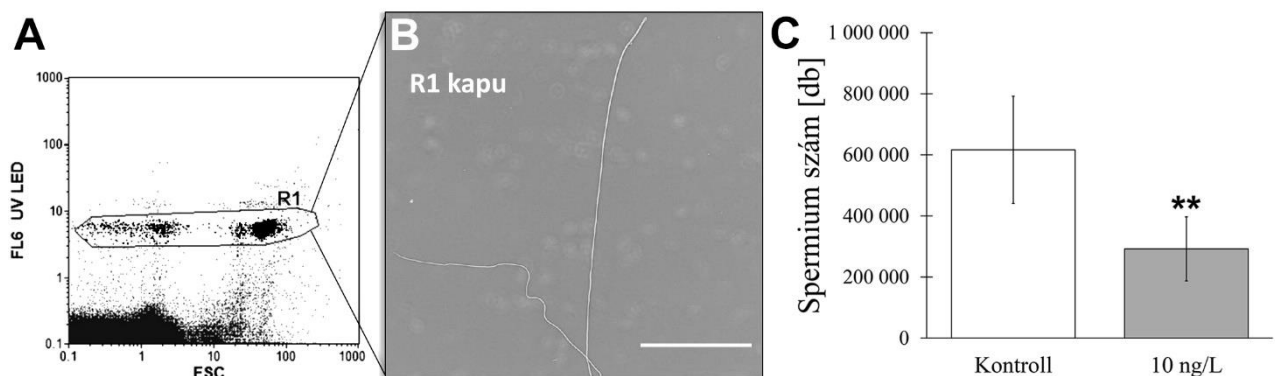
11. ábra A VG, RPG és RCG GnRH immunjelölődése kontroll és progesztogén kezelt csigákban. Kék szín jelzi a sejtmag jelölődést, piros szín jelzi a GnRH-szerű peptid immunpozitivitást. (A és B) A VG-ban a VD1 és a RPG-ban az RPD2 óriásneuronok jelölődése, valamint GnRH immunpozitív axonok vetülete a két ganglionban. Az A kép dorzális, a B kép ehhez képest mediális síkot jelenít meg. Mindkettőn látható, hogy a kontroll és a kezelt állatok óriássejtjei ugyanolyan intenzitással jelölődtek. Méretskála: 200 μ m. (C és D) A RCG GnRH-immunpozitív jelölődése a kontroll és kezelt állatokban közel azonos metszési síkban. A kontroll csoportban jelölődött sejtek kezelésben nem mutattak immunpozitivitást, csak a neuropilben volt látható GnRH jelölődés. Nyilak jelzik az egyes nem azonosított neuronok, csillag pedig a neuropil GnRH immunjelölődését. Méretskála: 50 μ m. Rövidítések: cbc – agydúc-pofadúc kapcsolat; cc – agydúcok közti kapcsolat; cplc – agydúc-falidúc kapcsolat; gn – ivarszervi ideg; in – bél ideg.



12. ábra L/RPeG a kontroll (A és C) és 10 ng/L progesztogén kezelt (B és D) állatokban. A kontroll csoportban látható sejtes GnRH-jelölődés a kezelt csoportban nem volt megfigyelhető. A GnRH-immunpozitív (piros) sejteket nyilak, a neuropil jelölődését csillag jelzi. A kék szín a sejtmagot jelöli. Méretskála: 50 μ m. Rövidítések: mpn – középső lábideg; sc – statociszta.

5.1.2.2 Spermium szám meghatározás

Mivel a reprodukció szabályozásában szerepet tulajdonítanak a GnRH-szerű peptideknek, ezek immunhisztokémiai eredményei felvetik a kérdést, hogy vajon a progesztogén kezelés hatása megjelenik-e az ivarsejtek szintjén is. Ennek felderítésére spermium szám mérést végeztünk áramlási citometriával magfestés után. A **13A ábra** a spermiumok felhőképét mutatja (x tengely (FSC – sejtméret; FL6 UV LED – mag festés), a **13B ábra** pedig az R1 kapu fénymikroszkópos képét sejtválogatás után. Az R1 kapu felhőjében jelet adó spermium fénymikroszkópos képét mutatja. A képen látható ép spermiumok (fej átlagosan 3,5 – 4,5 μm ; ostor ~600 – 800 μm) mellett letört ostorral (200 – 400 μm) rendelkező spermiumok is voltak, ez magyarázza az R1 kapuban elkülönülő két felhőt. A spermium számlálás eredménye szerint (**13C ábra**) a kezelés végén a 10 ng/L progesztogén kezelt csoport állatai szignifikánsan kevesebb ($292\,146 \pm 105\,034$ db/mL) spermiumot termeltek, mint a kontroll csoport állatai ($616\,464 \pm 175\,733$ db/mL).



13. ábra Spermium szám meghatározása *L. stagnalis*-ban áramlási citometriával. (A) A spermiumok áramlási citometriás felhőképe (R1 kapu) az örökítő anyag mennyisége (FL6 UV LED) és a méret függvényében (FSC). (B) Részecskeválogatás után az R1 kapuban található spermium fénymikroszkópos képe. Skála 100 μm . (C) Átlagos spermium szám a kontroll (fehér) és a 10 ng/L kezelt progesztogén kezelt (szürke) csoport állataiban a 3 hetes kezelési periódus végén. A csillag (**) szignifikáns eltérést jelöl ($P < 0,01$). [$t_{(24)} = 2,79$; $P < 0,01$; $n = 26$]. A hibasávok az adatsorok szórását jelzik.

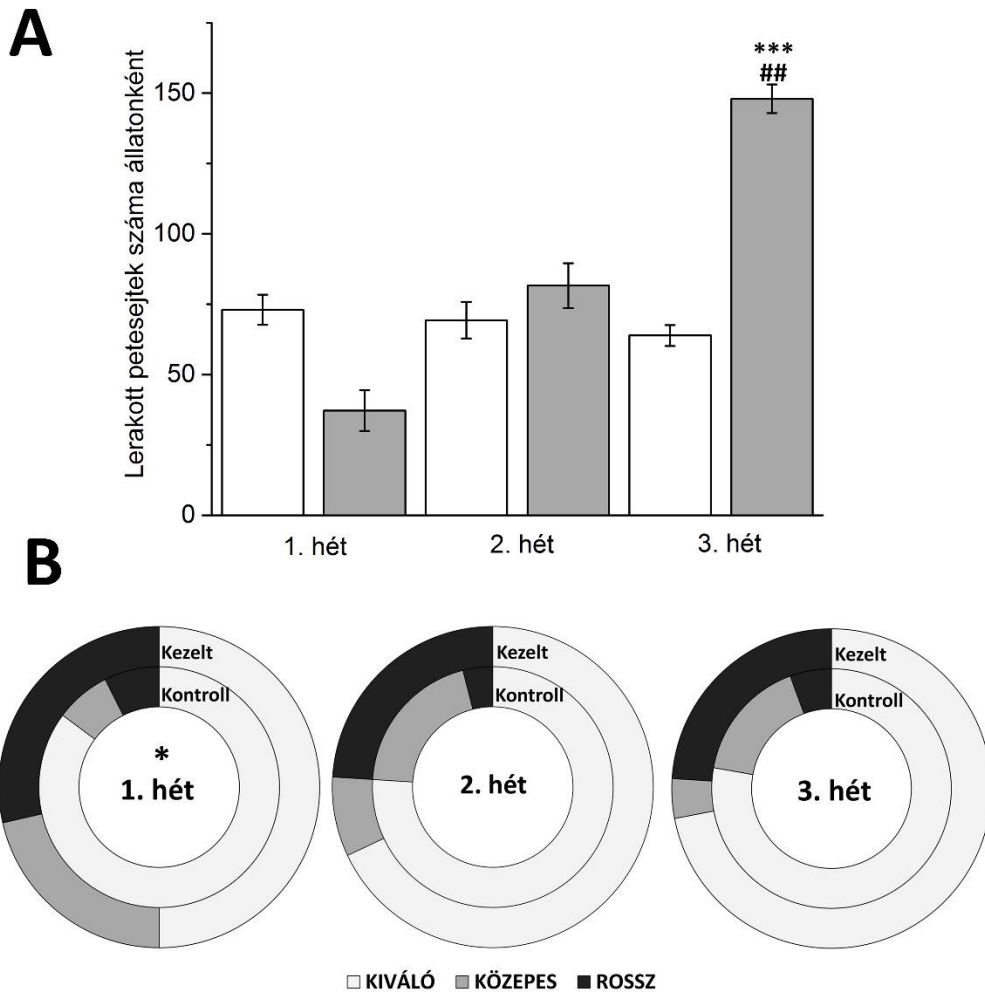
5.1.3 A nőstény reprodukciós rendszerben megfigyelt hatások

5.1.3.1 Petesejt szám és petezsák minőség

A GnRH-szerű peptid hím és nőstény reprodukcióban betöltött szerepe, valamint intenzitásának csökkenése a 10 ng/L-es progesztogén kezelés hatására, felveti azt a kérdést is, hogy a spermiumokhoz hasonlóan, vajon a petesejt termelés is változik-e a csigában. Ennek tisztázására vizsgáltuk a már lerakott, megtermékenyített petesejtek

(zigóták) számát. A VTG szint emelkedéséből arra számítottunk, hogy a lerakott zigóták száma emelkedő tendenciát mutat. Az egyes állatokra vetített petesejt termelés hétről hétre jelentős változást mutatott a 10 ng/L progesztogén kezelt csoportban (**14A ábra**). Az első héten a kezelt csoport egyedei átlagosan $37,18 \pm 7,20$ darab megtermékenyített petesejtet raktak állatonként, míg a második és harmadik héten átlagosan $81,60 \pm 7,95$, illetve $148,00 \pm 5,10$ darabot. Ez az emelkedő dinamikájú petesejt termelés a harmadik hét végére már szignifikánsan különbözött a kontroll csoport állatainak átlagos petesejt termelésétől, annak több mint kétszerese volt. A kontroll csoport állatainak petesejt termelése a három hét alatt hasonló dinamikát mutatott: állatonként átlagosan $73,00 \pm 5,36$ petesejtet termeltek az első, $69,33 \pm 6,45$ a második és $63,94 \pm 3,70$ petesejtet a harmadik héten.

A petezsákok minőségének vizsgálata szerint a 10 ng/L progesztogén kezelt csoport állatai az első héten szignifikánsan rosszabb minőségű petezsákokat raktak (50,00% kiváló; 21,43% közepes; 28,57% rossz) a kontroll csoporthoz képest (85,19% kiváló; 7,41% közepes; 7,41% rossz). A kísérlet második és harmadik hetén már nem volt megfigyelhető jelentős különbség a két csoport között (**14B ábra**). A kontroll csoportban 76,00% és 77,80% volt kiváló, 20,00% és 16,60% volt közepes, valamint 4,00% és 5,60% volt rossz minőségű kategóriába sorolható petezsák. A kezelt csoportban 68,00% és 72,00% volt kiváló, 8,00% és 4,00% volt közepes, valamint 24,00% és 24,00% volt rossz kategóriába sorolható petezsák.



14. ábra A petesejt termelés és a petezsákok minőségének változása a felnőtt állatok progesztogén kezelésének hatására. (A) A lerakott petesejtek száma állatonként nem mutatott szignifikáns különbséget az első és a második héten a csoportok közt [$F_{(1,39)}=0,11$; $P=0,91$; $n=40$ és $F_{(1,48)}=0,91$; $P=0,38$; $n=49$]. A harmadik héten azonban a 10 ng/L progesztogén kezelt csoport állatainak petesejt termelése a kontrolltól szignifikánsan eltért [$F_{(1,41)}=8,84$; $P<0,01$; $n=42$]. A kontroll csoport állatai a három hét alatt közel azonos számú petesejtet produkáltak állatonként, az egyes hetek között csoporton belül nem volt szignifikáns eltérés [$F_{(2,67)}=2,45$; $P=0,094$; $n=69$]. A kezelt csoport állatainak petesejt produkciója azonban jelentősen eltért a hetek között csoporton belül [$F_{(2,61)}=8,27$; $P<0,001$; $n=63$]. A Tamhane post hoc teszt szerint jelentős különbség van az első és a harmadik hét [$P<0,001$], illetve a második és a harmadik hét [$P<0,01$] adatai között is. Csillaggal jelöltük a $P<0,01$ (##) és a $P<0,001$ (***) jelentős eltéréseket. A fehér oszlopok a kontroll csoport adatai, a szürke oszlopok a 10 ng/L progesztogén kezelt csoport adatait jelzik, a diagram hibásávjai pedig az adatsorok szórását. (B) Az ábra a petezsákok minőség kategóriák szerinti eloszlását demonstrálja a kontroll és a kezelt csoportban. A petezsákok kiváló (fehér), közepes (szürke) vagy rossz (fekete) minőségű értékelést kaptak az első, második és harmadik héten. Az első héten a két csoport petezsákjainak minőség eloszlása szignifikánsan különbözött (Kruskal-Wallis $\chi^2 = 6,31$; $P<0,05$; $n=41$), a következő két héten azonban ez a különbség eltűnt (Kruskal-Wallis $\chi^2=3,65$; $P=0,56$; $n=50$ és $\chi^2=0,15$; $P=0,70$; $n=43$). Csillaggal jelöltük a $P<0,05$ (*) jelentős eltérést.

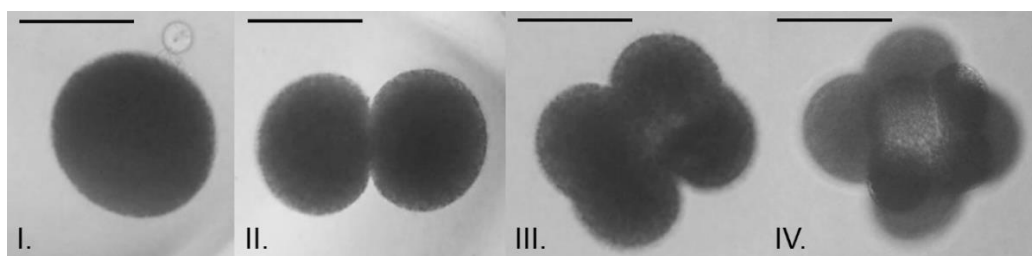
5.1.4 A szülők progesztogén kezelésének utódokra kifejtett hatása

5.1.4.1 Progesztogének indukálta változások az embrionális fejlődés korai szakaszában

A progesztogén keverék hatását vizsgálva különbséget figyeltünk meg sejt szinten, a zigóták korai fejlődésének sebességében. Az embriógenézist az embrió egysejtes állapotától figyeltük (I. stádium, **4. táblázat**), az időzítés kezdetének pedig az első sejtosztódást vettük (II. stádium, két sejt), mivel ez állapítható meg pontosan. A kontroll csigáktól származó zigóták a második sejtosztódást (III. stádium, négy sejt) átlagosan 131 ± 12 perc alatt érték el, a harmadik osztódáson (IV. stádium, nyolc sejt) pedig 110 ± 4 perc múlva mentek keresztül. Az első három sejtosztódás teljes időablaka így 241 ± 14 perc volt ($n=6$). Ezzel szemben a 10 ng/L kezelt csoportban ez 222 ± 4 perc alatt lezajlott ($n=7$). Ebben a csoportban a III. stádiumot 115 ± 17 perc alatt, a IV. stádiumot 106 ± 5 perc alatt érték el a zigóták. A sejtosztódás időablakát az **4. táblázatban** foglaltuk össze.

4. táblázat A sejtproliferáció időablaka az embriógenézis korai szakaszában.

Méretskála: $100 \mu\text{m}$.



	Fejlődési stádium	Kontroll	10 ng/L kezelt	Sejtméret (μm)
I.	Egysejtes zigóta			~ 120
II.	2 sejt (1. osztódás)	Start pont	Start pont	~ 100
III.	4 sejt (2. osztódás)	$131 \pm 12 \text{ min}$	$115 \pm 7 \text{ min}$	~ 100
IV.	8 sejt (3. osztódás)	$110 \pm 4 \text{ min}$	$106 \pm 5 \text{ min}$	Különböző sejtméret
Totál:		$241 \pm 14 \text{ min}$	$222 \pm 4 \text{ min}$	
Kikelés:		$13 \pm 0,7 \text{ nap}$	$14 \pm 0,8 \text{ nap}$	

5.1.4.2 A zigóta részleges metabolomikai elemzése

A felgyorsult sejtosztódást a progesztogén kezelt csoportban okozhatja többlet tápanyagok/kofaktorok jelenléte, vagy a metabolizmus hormonális hatásra történő változása. Ennek felderítésére megvizsgáltuk az egy-sejtes állapotú zigóta metabolit

profilját MS alkalmazásával. Az **5. táblázat** összefoglalása annak a fragmentálással igazolt szerkezetű, 26 azonosított metabolitnak, amit megtermékenyített, frissen lerakott (<1h) petesejtből sikerült kimutatnunk. Az MS eredményeink alapján elmondható, hogy nincs molekuláris különbség a kontroll és a kezelt csigáktól származó zigóták metabolit profiljában. A 26 azonosított molekula közül azonban csak arra a következő ötre fókuszáltunk a továbbiakban, amelyek tükrözik a sejt általános energetikai állapotát (**15A ábra**): AMP (346,05 m/z), ADP (426,02 m/z), ATP (505,98 m/z), UDP-hexNAc (606,07 m/z) és az UDP-hex (565,04 m/z). Az adenilát energiaforrás nem mutatott jelentős különbséget a két csoport zigótái közt: az AEC arány $0,63 \pm 0,11$ (kontroll) és $0,49 \pm 0,12$ (kezelt) (**15B ábra**) volt. A hexóz felhasználás viszont szignifikánsan csökkent a 10 ng/L progesztogén kezelt csoportban ($0,50 \pm 0,11$) a kontroll csoporthoz képest ($1,16 \pm 0,36$) (**15C ábra**).

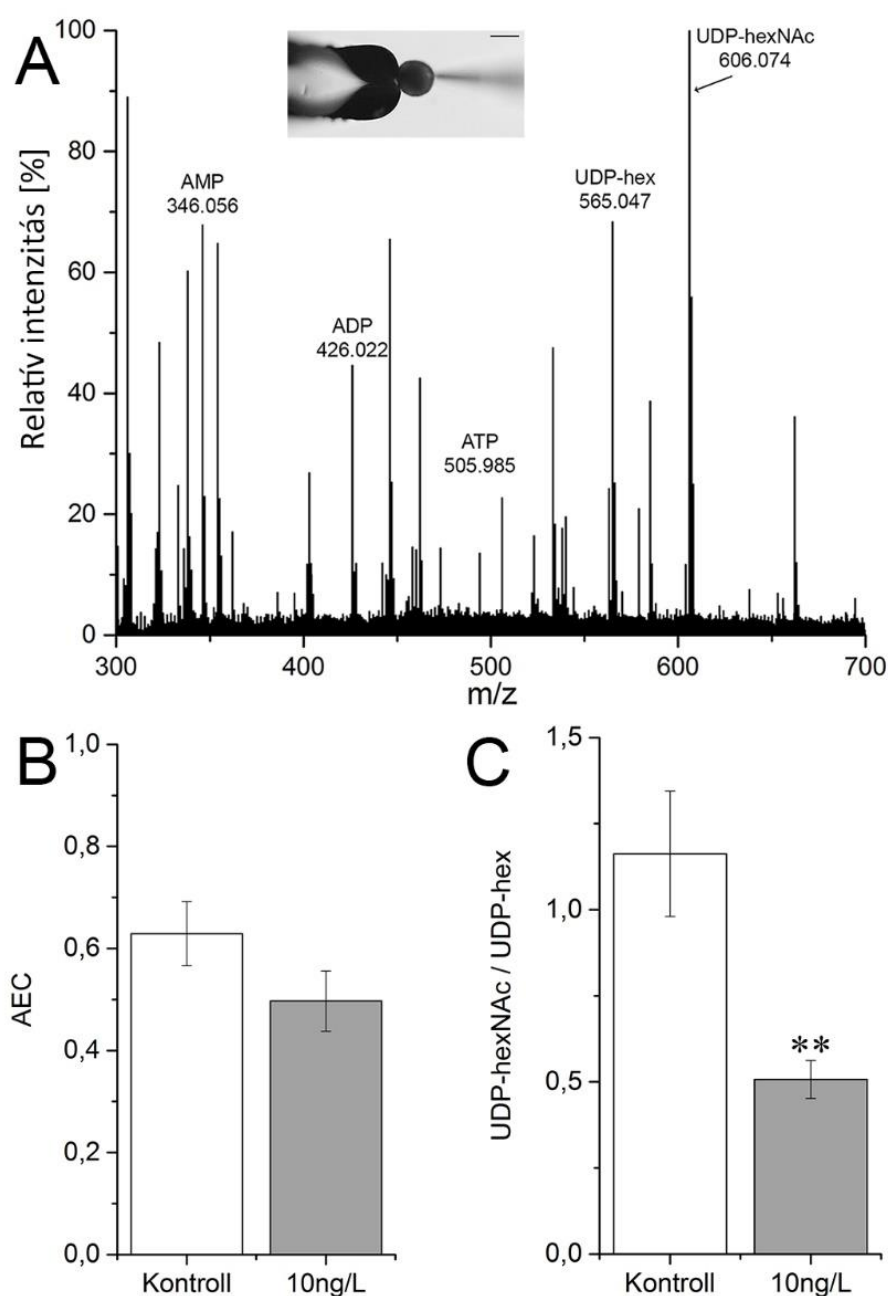
5. táblázat Az egysejtes zigótában (peterakást követő egy órán belül) és a szikanyagban (peterakást követő 1. és 96. órában) azonosított molekulák.

Az egysejtes zigótában detektált molekulák							
Azonosított molekula	Formula	Kalkulált monoizotópos tömeg [Da]	Mért monoizotópos tömeg [Da]	Δtömeg [mDa]	Fragmens tömeg [Da]	CCS ^{mért} [Å ²]	CCS ^{ref} [Å ²]
1. Glutamin	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃	145,0618	145,059	3,2		121,4	126
2. Glutamin sav	C ₅ H ₉ NO ₄	146,0458	146,031	14,4		119,0	123
3. Glicerol foszfát	C ₃ H ₉ O ₆ P	171,0063	171,006	0,3			
4. Hexóz foszfát	C ₆ H ₁₃ O ₉ P	259,0224	259,021	1,8		142,6	143
5. UMP	C ₉ H ₁₃ N ₂ O ₉ P	323,0286	323,030	-1,6		155,6	158
6. CDP-etanolamin	C ₁₁ H ₂₀ N ₄ O ₁₁ P ₂	445,0531	445,036	17,0		185,3	185
7. CTP	C ₉ H ₁₆ N ₃ O ₁₄ P ₃	481,9772	481,977	0,2			
8. UTP	C ₉ H ₁₅ N ₂ O ₁₅ P ₃	482,9613	482,954	7,7		178,0	179
9. UDP-hexóz	C ₁₅ H ₂₄ N ₂ O ₁₇ P ₂	565,0478	565,047	1,0	241,013; 323,029; 384,988	207,2	204
10. Oxidált glutation (GSSG)	C ₂₀ H ₃₂ N ₆ O ₁₂ S ₂	611,1447	611,118	26,8		219,2	218

A szikanyagban detektált molekulák							
Azonosított molekula	Formula	Kalkulált monoizotópos tömeg [Da]	Mért monoizotópos tömeg [Da]	Δtömeg [mDa]	Fragmens tömeg [Da]	CCS ^{mért} [Å ²]	CCS ^{ref} [Å ²]
1. IMP	C ₁₀ H ₁₃ N ₄ O ₈ P	347,0398	347,052	-12,6		162,4	162
2. IMP +Na	C ₁₀ H ₁₃ N ₄ O ₈ P	369,0218	369,036	-13,9		163,8	164
3. ADP +Na	C ₁₀ H ₁₅ N ₅ O ₁₀ P ₂	448,0045	448,009	-4,6		185,0	184
4. UDP-hexNAc + K	C ₁₇ H ₂₇ N ₃ O ₁₇ P ₂	644,0302	644,031	-0,4		229,4	
5. NADH	C ₂₁ H ₂₉ N ₇ O ₁₄ P ₂	664,1175	664,115	2,4	272,951; 335,054; 346,051; 397,013; 408,005		

Az egysejtes zigótában és a szikanyagban is detektált molekulák							
Azonosított molekula	Formula	Kalkulált monoizotópos tömeg [Da]	Mért monoizotópos tömeg [Da]	Δtömeg [mDa]	Fragmens tömeg [Da]	CCS ^{mért} [Å ²]	CCS ^{ref} [Å ²]
1. GSH	C ₁₀ H ₁₇ N ₃ O ₆ S	306,0765	306,077	-0,3		158,3	159
2. CMP	C ₉ H ₁₄ N ₃ O ₈ P	322,0446	322,044	0,4		156,4	160
3. GSH +Na	C ₁₀ H ₁₇ N ₃ O ₆ S	328,0452	328,052	7,2		159,8	160

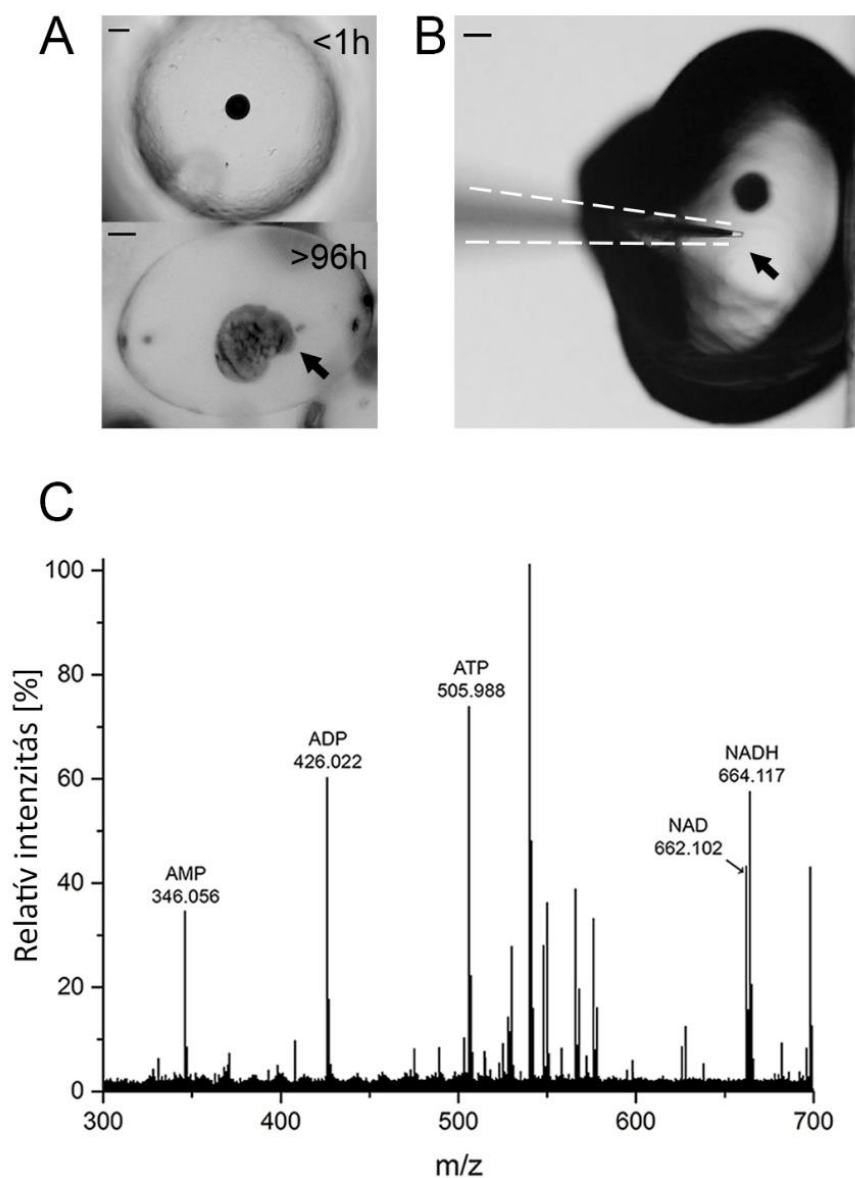
4.	AMP	$C_{10}H_{14}N_5O_7P$	346,0558	346,056	0,3	78,957; 96,959; 134,045; 210,994	167,6	169
5.	GMP	$C_{10}H_{14}N_5O_8P$	362,0507	362,047	3,8		163,3	165
6.	CDP	$C_9H_{15}N_3O_{11}P_2$	402,0109	402,011	-0,1		174,3	172
7.	UDP	$C_9H_{14}N_2O_{12}P_2$	402,9949	402,995	-0,4		168,2	169
8.	ADP -H ₂ O	$C_{10}H_{15}N_5O_{10}P_2$	408,0116	408,014	-1,9		176,1	177
9.	ADP	$C_{10}H_{15}N_5O_{10}P_2$	426,0221	426,022	-0,2	134,045; 158,923; 272,955; 328,044; 346,054; 408,010	180,9	180
10.	GDP	$C_{10}H_{15}N_5O_{11}P_2$	442,0171	442,013	4,0		176,9	178
11.	ATP	$C_{10}H_{16}N_5O_{13}P_3$	505,9885	505,985	3,8	78,957; 158,924; 238,889; 272,951; 408,008; 426,017	189,1	192
12.	GTP	$C_{10}H_{16}N_5O_{14}P_3$	521,9834	522,002	-18,6		191,1	190
13.	ciklikusADP ribóz	$C_{15}H_{21}N_5O_{13}P_2$	540,0538	540,053	0,6		209,2	
14.	GDP-hexóz	$C_{16}H_{25}N_5O_{16}P_2$	604,0699	604,059	10,9		214,0	212
15.	UDP-hexNAc	$C_{17}H_{27}N_3O_{17}P_2$	606,0743	606,074	0,6	282,036; 362,006; 384,985; 402,996	222,1	
16.	NAD	$C_{21}H_{27}N_7O_{14}P_2$	662,1019	662,102	0,0	272,951; 328,037; 346,051; 408,005; 426,017; 540,047	223,0	226



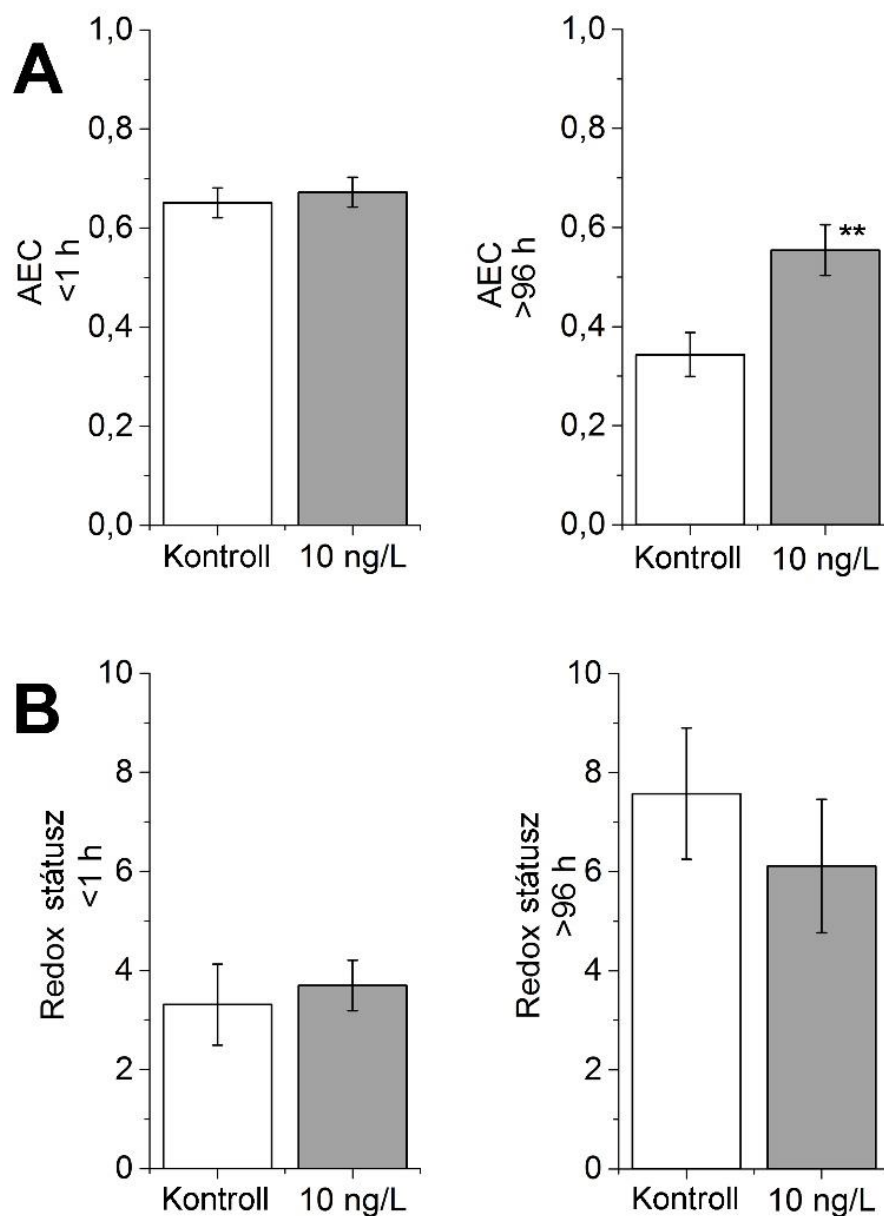
15. ábra Az egy-sejtes zigóta metabolomikai elemzésének folyamata. (A) Az egy-sejtes zigóta citoplazmájának reprezentatív tömegspektruma 300–700 m/z mérési tartományban, mely a kiemelt molekulákat jeleníti meg. A betét-kép a mikromintavételi procedúrát mutatja, jobbról balra a következők szerint: tartó kapilláris, az egy-sejtes zigóta (<1 h) és a mintavételi kapilláris. A skála 100 μ m. (B) Az adenilát energiahordozó molekulák aránya (AEC) nem mutatott jelentős különbséget [$t_{(1,9)}=-1,77$; $P=0,110$; $n=10$] a kontroll és a kezelt csoport között. (C) Az UDP-hexNAc/UDP-hex arány szignifikánsan csökkent [$t_{(1,9)}=3,83$; $P<0,01$; $n=10$] a 10 ng/L progesztogén kezelt csoportban a kontrollhoz képest. A fehér oszlopok minden esetben a kontroll csoportot jelzik, a szürkék pedig a kezelt csoportot. Csillaggal (**) jelöltük a $P<0,01$ szignifikáns eltérést, a hibasávok az adatsorok szórását jelenítik meg.

5.1.4.3 A szikanyag részleges metabolomikai elemzése

A szikanyag metabolit tartalmát is elemeztük, melynek általános molekuláris profilját, 21 azonosított metabolittal szintén az **5. táblázat** foglalja össze. Két fejlődési állapotban vettünk mintát az embriót körülvevő szikanyagból: a petezsák lerakását követő egy órán belül (egy-sejtes zigóta állapot) és 96 óra után (a metamorfózis kezdete, az általános kikelési idő fele) (**16A és B ábra**). Az MS eredményeink alapján elmondható, hogy nincs molekuláris különbség az 1 órás és a 96 órás, valamint a kontroll és a kezelt csigáktól származó tojások szikanyagának metabolit profiljában. Az **16C ábra** egy reprezentatív tömegspektrumot (300–700 m/z) mutat a szikanyagban azonosított molekulákról, amelyekből az AEC relatív arányát és a redox státuszt határoztuk meg. Az 1 órás szikanyag AEC értéke nem különbözött a kontroll ($0,65 \pm 0,03$) és a kezelt ($0,67 \pm 0,03$) csoportokban, de a 96 órás szikanyag AEC értéke már jelentősen eltért ($0,34 \pm 0,04$ a kontroll és $0,55 \pm 0,05$ a kezelt csoportban). Más megközelítésben ez azt is jelenti, hogy a kontroll csoport csökkent AEC értéke a 96 órás szikanyagban kevesebb detektált ATP-re és ADP-re utal a kezdeti 1 órás státuszhoz képest. Ezzel szemben a kezelt csoportban a 96 órás szikanyag AEC értéke alig csökkent a kezdeti 1 órás stádiumhoz képest (**17A ábra**). A szikanyag redox státusza nem változott jelentősen a kezelt csoportban a kontrollhoz képest, sem az 1 órás, sem a 96 órás stádiumban (**17B ábra**). Habár értéke növekvő tendenciát mutatott az embriógenezis során: $3,31 \pm 0,92$ (kontroll) és $3,69 \pm 0,51$ (kezelt) volt az 1 órás tojások szikanyagában, illetve $7,54 \pm 1,30$ (kontroll) és $6,11 \pm 1,30$ (kezelt) a 96 órás tojások szikanyagában. A szikanyag redox státuszának ilyen jellegű eltolódása a szikanyag redukzív kapacitásának növekedésére (több NADH) utal.



16. ábra Szikanyag mikromintavétel metabolomikai elemzéshez csigatojásból. (A) 1 órás (felső) és 96 órás (alsó) tojás. A nyíl a talp kialakulásának kezdetét mutatja, mely a metamorfózis előtti állapotot jelzi. (B) A szikanyag kapilláris mikromintavétele 1 órás tojásból. A kapillárist szaggatott vonal jelzi, a nyíl pedig a kapilláris bemeneti végét. A és B méretskála: 100 μm . (C) A szikanyag reprezentatív tömegspektruma 300–700 m/z mérési tartományban, mely a kiemelt molekulákat jeleníti meg (AEC és redox státusz).

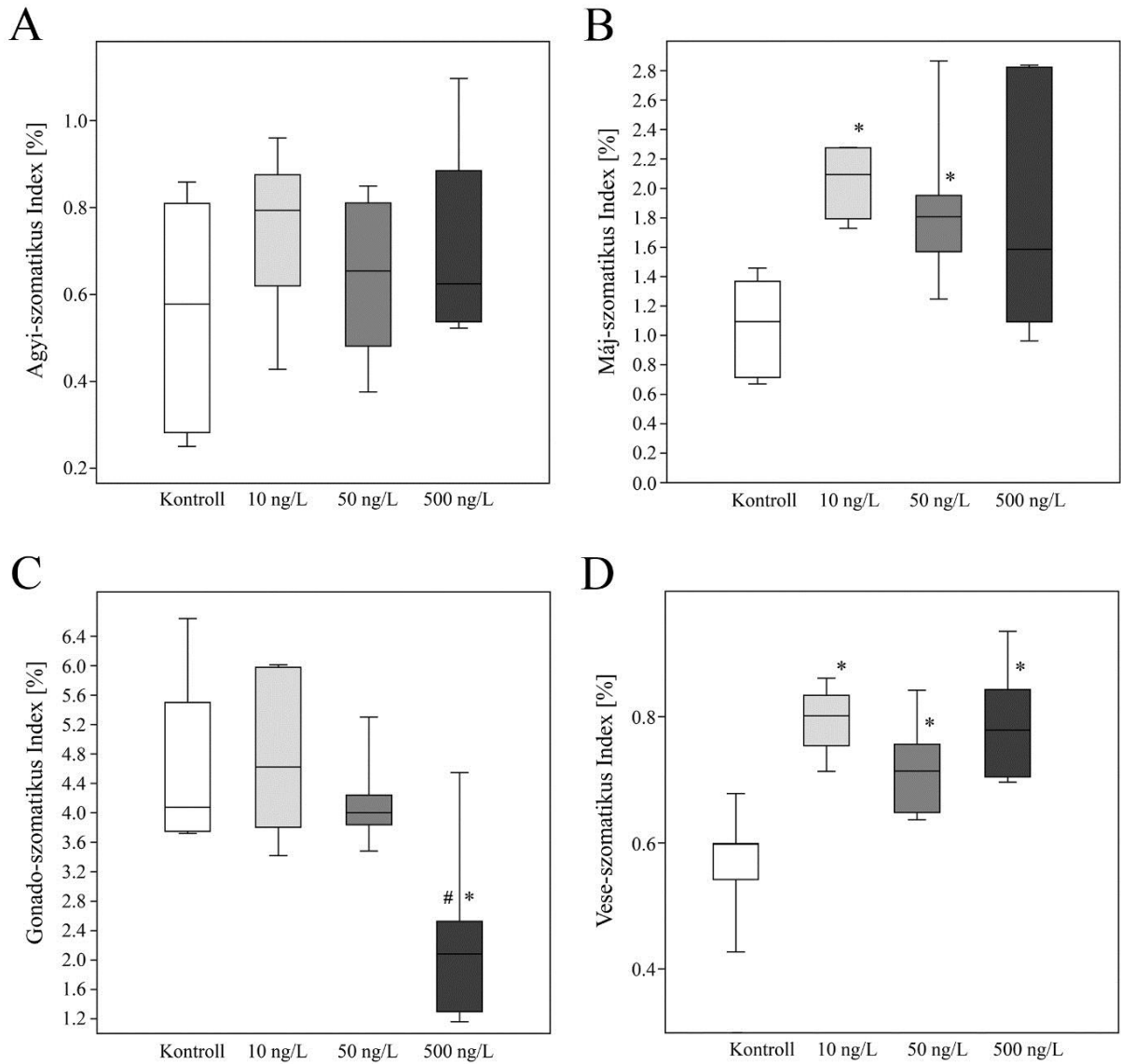


17. ábra A szikanyagban található egyes metabolitok arányának elemzése. (A) A kontroll és kezelt csoport AEC aránya közti különbség látható 1 órás (bal) és 96 órás (jobb) szikanyagból. Az 1 órás szikanyag AEC értékében nem volt különbség [$t_{(1,11)} = -0,516$, $P = 0,61$; $n = 12$] a két csoport között, de a 96 órás szikanyag AEC értékei már szignifikánsan eltértek [$t_{(1,10)} = -3,691$, $P < 0,01$; $n = 11$]. (B) A szikanyag redox státusza az 1 órás (bal) és 96 órás (jobb) tojásban. Sem az 1 órás [$t_{(1,11)} = -0,52$; $P = 0,62$; $n = 12$], sem a 96 órás [$t_{(1,9)} = 0,90$; $P = 0,39$; $n = 10$] szikanyag redox értéke nem tért el jelentősen a kontroll és a kezelt csoportok között. A 96 órás szikanyag redox értékei emelkedtek az 1 órás szikanyaghoz képest mindkét csoportban. A fehér oszlop minden esetben a kontroll, a szürke pedig a 10 ng/L kezelt csoportot jeleníti meg. Csillaggal (**) jelöltük a $P < 0,01$ szignifikancia szintet, a hibasávok az adatsorok szórását jelzik.

5.2 Progesztogének hatása a bodorkában

5.2.1 Morfológiai változások

A kísérleti állatoknál hossznövekedést, valamint súlyvesztést tapasztaltunk a 42 napos kezelési periódus után, azonban ezek a változások nem tértek el szignifikánsan az egyes kezelési csoportok között. A szomatikus indexek vizsgálatakor már szignifikáns eltéréseket figyeltünk meg a kontroll és a kezelt csoportok összehasonlításakor (**18. ábra**). Az agy teljes testsúlyhoz viszonyított tömegében (ASI) nem tapasztaltunk változást a négy csoport között. Ez az érték a kontrollban $0,58 \pm 0,23$, a 10 ng/L kezelés után $0,72 \pm 0,19$, az 50 ng/L csoportban $0,65 \pm 0,18$, míg az 500 ng/L kezelésben $0,70 \pm 0,21$ volt. A másik három változó (MSI, GSI, VSI) azonban a kontrollhoz viszonyítva szignifikáns eltérést mutatott a progesztogén kezelés hatására. Az MSI a kontroll csoport $1,09 \pm 0,28$ értékéhez képest a 10 ng/L kezelésben $2,06 \pm 0,23$, az 50 ng/L csoportban pedig $1,86 \pm 0,46$ értékre emelkedett. Az 500 ng/L kezelés az MSI értékre nem volt jelentős hatással. A VSI értékek a kontroll csoport $0,56 \pm 0,08$ értékéhez képest a 10 ng/L kezelésben $0,79 \pm 0,06$, az 50 ng/L csoportban $0,70 \pm 0,08$, az 500 ng/L kezelést követően pedig $0,79 \pm 0,08$ értékkel mutatott szignifikáns növekedést. Az egyes progesztogén kezelt csoportok eredményei egymástól nem tértek el jelentősen. Az 500 ng/L progesztogén kezelés a GSI indexre jelentős hatással volt, az $2,18 \pm 1,27$ értékre csökkent a másik három csoporthoz képest (kontroll: $4,62 \pm 1,19$; 10 ng/L: $4,67 \pm 1,02$; 50 ng/L: $4,14 \pm 0,62$).



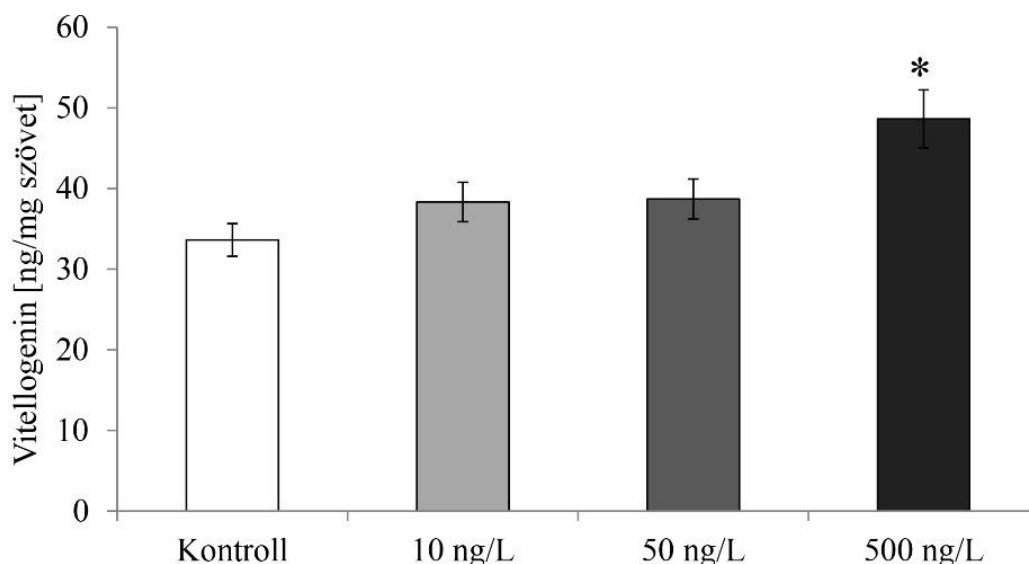
18. ábra A kontroll és kezelt csoportok szomatikus indexei (A – ASI, B – MSI, C – GSI, D – VSI). * - a kontroll és a kezelt, # - a kezelt csoportok közötti szignifikáns eltéréseket jelöli $P < 0.05$ szignifikancia szinten vizsgálva. A dobozóra mutatja a maximum és minimum értékeket, a minta interkvartilis terjedelmét és mediánját.

5.2.2 Molekuláris változások

5.2.2.1 A máj VTG tartalma

Vizsgáltuk a máj VTG tartalmát kezeléseik előtt és után „szendvics” ELISA módszerrel. Eredményeink alapján a progesztogén kezelés hatására emelkedett a VTG koncentráció nőstény bodorkák májszövetében (**19. ábra**), jelentős emelkedést azonban csak az 500 ng/L progesztogén kezelt csoportban figyeltünk meg (kontroll: $33,65 \pm 4,03$ ng/mg szövet; 500 ng/L: $48,62 \pm 7,21$). Azonban az alacsonyabb, 10 és 50

ng/L progesztogén kezelés is láthatóan hatással volt a VTG szintre. Mivel a VTG inkább az ösztrogének kimutatására elfogadott biomarker, munkánk során próbáltunk azonosítani olyan lehetséges markert, amely nagyobb érzékenységet mutat progesztogén szennyezésre és független a nemektől (lásd: 5.2.2.2).

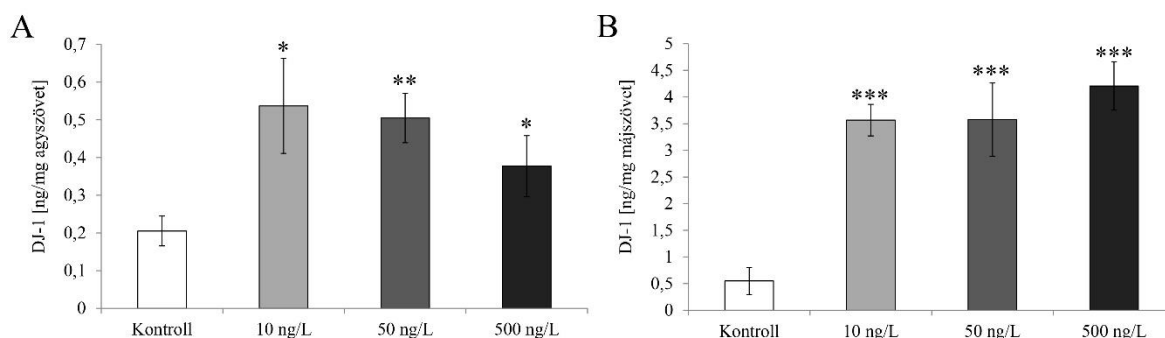


19. ábra A különböző koncentrációjú progesztogén kezelés hatása a VTG szintekre bodorkában. Szignifikáns eltérést [$F_{(2,3)}=8,22$, $P<0,05$] találtunk a kontroll és a 500 ng/L progesztogén kezelt csoport között (*) (A hibasávok az adatsorok szórását jelzik, $n=3$ csoportonként).

5.2.2.2 DJ-1 fehérje vizsgálata agyban és májban

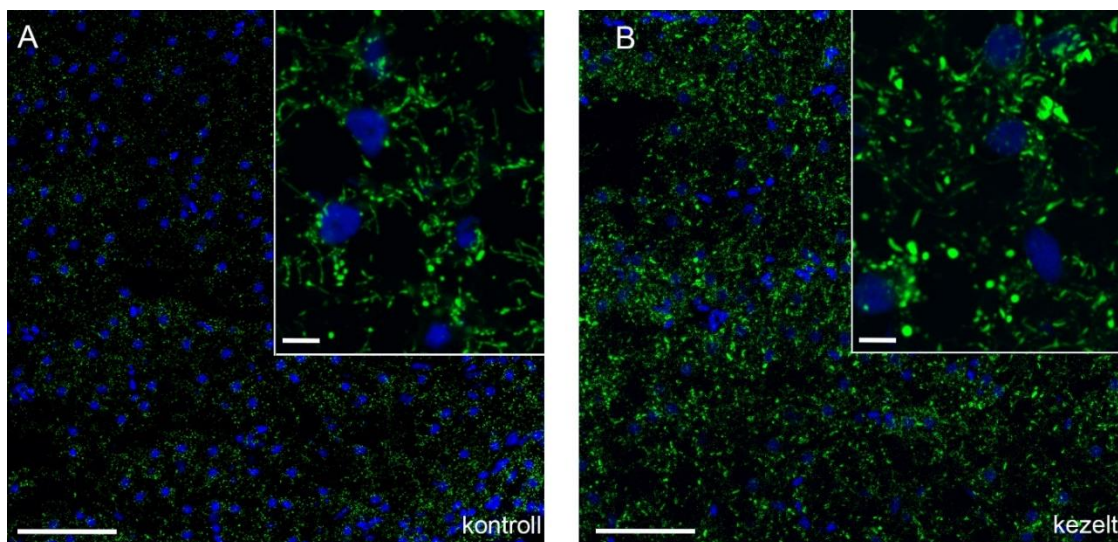
Vizsgáltuk a DJ-1 védő fehérje, mint a progesztogén szennyezésben használható lehetséges biomarker, mennyiségi viszonyait agy és máj szövetmintákban a kezelések előtt és után „szendvics” ELISA módszerrel. A hím ($0,21\pm0,04$; $0,55\pm0,21$ ng/mg szövet, $n=4$) és nőstény ($0,19\pm0,04$; $0,53\pm0,03$ ng/mg szövet, $n=6$) egyedek között nem figyeltünk meg szignifikáns eltérést sem az agy, sem a máj mintákban kontroll körülmények között. Ezért a továbbiakban a hím és a nőstény egyedeket nem értékeltük külön. A **20A ábra** a progesztogén kezelés indukálta agyi DJ-1 fehérje szint emelkedését mutatja. Az összes kezelési csoport DJ-1 szintje (10 ng/L: $0,54\pm0,13$; 50 ng/L: $0,50\pm0,07$; 500 ng/L: $0,38\pm0,08$ ng/mg szövet) szignifikánsan különbözött a kontroll csoporttól ($0,20\pm0,04$ ng/mg szövet). Érdekeség, hogy a legnagyobb változást a 10 ng/L progesztogén kezelt csoport mutatta és a kezelési koncentráció

növelésével mérséklődött a DJ-1 fehérje szint emelkedése. A **20B ábra** a progesztogén kezelés indukálta DJ-1 fehérje szint szignifikáns növekedését mutatja májmintákban valamennyi kezelési koncentráció esetében (10 ng/L: $3,64 \pm 0,30$; 50 ng/L: $3,65 \pm 0,69$; 500 ng/L: $4,22 \pm 0,45$ ng/mg szövet) a kontroll csoporthoz ($0,54 \pm 0,25$ ng/mg szövet) képest. Az agyi mintákkal ellentétben, a kezelési koncentráció növelésével a DJ-1 fehérje szint emelkedése volt megfigyelhető.



20. ábra DJ-1 fehérje koncentráció meghatározása „szendvics” ELISA módszerrel bodorka agyban és májban. A függőleges tengely a DJ-1 fehérje koncentrációját mutatja [ng/mg szövet], míg a vízszintes tengely a kezelési csoportokat ábrázolja ($n=6$ csoportonként). A DJ-1 fehérje tartalmat tekintve a kezelt csoportok a kontroll csoporttól eltértek, de egymás között mutattak jelentős eltérést sem az agyban, sem a májban. Az agyban független mintás T-próbával szignifikáns eltérést mutattunk ki a kontroll és a 10 ng/L [$t_{(10)}=-3,08$; $P<0,05$], a kontroll és az 50 ng/L [$t_{(10)}=-4,80$; $P<0,01$], valamint a kontroll és az 500 ng/L kezelt csoport között [$t_{(10)}=-2,33$; $P<0,05$]. A májban független mintás T-próbával szignifikáns különbséget mutattunk ki a kontroll és a 10 ng/L [$t_{(10)}=-11,47$; $P<0,01$], a kontroll és az 50 ng/L [$t_{(10)}=-6,41$; $P<0,01$], valamint a kontroll és az 500 ng/L kezelt csoport között [$t_{(10)}=-9,71$; $P<0,01$]. *** $P<0,001$; ** $P<0,01$; * $P<0,05$. A diagram hibasávjai az adatsor szórását jelzik.

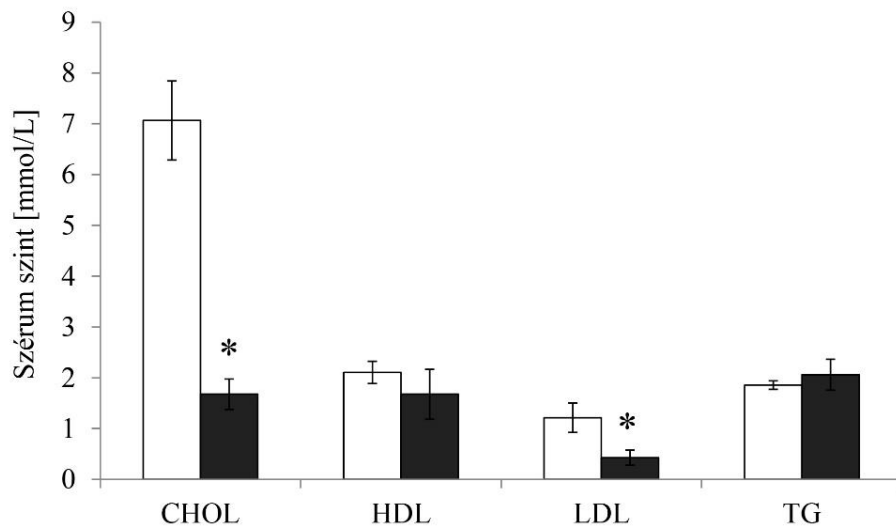
Az agyban alacsonyabb DJ-1 koncentrációkat mértünk, mint a máj minták esetében, ez alapján kontroll és 500 ng/L progesztogén kezelt állatok máján IHC kísérleteket is végeztünk. A **21A ábra** egy tipikus IHC képet jelenít meg egy kontroll bodorka májszövet metszetéről, amelyen hasonló méretű immunopozitív partikulumok láthatók homogén eloszlásban. Az 500 ng/L progesztogén kezelt csoportban (**21B ábra**), az immunoreaktív DJ-1 fehérje mennyiségének növekedését figyeltük meg, valamint a partikulumok aggregációját a sejtmagok (kék szín) körül.



21. ábra DJ-1 immunpozitív elemek eloszlása a bodorka májszövetében 500 ng/L progesztogén kezelés előtt (A) és után (B). A sejtmagokat Hoechst 33342 festéssel (kék szín), míg a DJ-1 fehérje eloszlását Alexa488 festéssel (zöld szín) jelenítettük meg. Méretarány 5 μ m és 50 μ m.

5.2.2.3 Szérum lipid szintek

A bevezetőben bemutatott szignalizációs útvonalak lehetséges kapcsolódásai alapján (**1. ábra**) vizsgáltuk a progesztogén kezelés hatását a szérum koleszterin, HDL-, LDL-koleszterin és triglicerid szintekre (**22. ábra**). A kontroll és az 500 ng/L progesztogén kezelt csoportokat összehasonlítva a szérum koleszterin (kontroll: $7,06 \pm 1,55$; 500 ng/L: $4,63 \pm 0,60$ mmol/L) és az LDL-koleszterin (kontroll: $1,21 \pm 0,57$; 500 ng/L: $0,43 \pm 0,29$ mmol/L) szintek kezelés hatására bekövetkező szignifikáns csökkenését figyeltük meg. A HDL-koleszterin (kontroll: $2,10 \pm 0,43$; 500 ng/L: $1,67 \pm 0,98$ mmol/L) és triglicerid (kontroll: $1,85 \pm 0,16$; 500 ng/L: $2,06 \pm 0,60$ mmol/L) szintek azonban nem mutattak szignifikáns eltérést.



22. ábra Progesztogén kezelés hatása a szérumból meghatározott lipid szintekre. Jelentős különbség (*) volt kimutatható a kontroll és az 500 ng/L kezelt csoportok között a koleszterin szint ($P < 0,05$, Mann-Whitney U teszt) és esetében az LDL-koleszterin szint [$t_{(7)} = 2,65$; $P < 0,05$] esetén ($n = 4$ csoportonként). A fehér oszlopok a kontroll, míg a fekete oszlopok a kezelt csoportot reprezentálják, a diagram hibásávjai az adatsor szórását jelzik.

5.2.2.4 Stressz fehérjék vizsgálata

A lipid szintekhez hasonlóan szérumból határoztunk meg különböző, stresszben fokozottan kifejeződő fehérjéket. 26 szérumból vizsgáltuk a progesztogén kezelés hatását, paralel módon. Ezek a fehérjék különböző biológiai funkcióval rendelkeznek: metabolikus (FABP-1; PON1; PON3), apoptotikus (BCL-2; Citokróm c; Foszfo-JNK Pan; Foszfo-p38a), antioxidatív (PON2; Tioredoxin-1; SIRT2; SOD2), stressz (HIF-1 alfa; HIF-2 alfa; Foszfo-HSP27; HSP60; HSP70; NFkB1; Foszfo-p53), sejt differenciáció és proliferáció (ADAMTS1; Cited-2; Dkk-4; p21/CIP1; p27), katalitikus (szénsav-anhidráz IX; IDO) vagy gyulladás gátló (COX-2). A kontroll és 500 ng/L progesztogén kezelt csoportokból származó szérumból mintákat hasonlítottunk össze. A különböző biológiai funkciójú fehérjék nem mutattak egységes változást a progesztogén kezelés hatására, találtunk növekvő, csökkenő és változást nem mutató fehérjéket is. Az egyes fehérje szintek változását a **6. táblázatban** foglaltuk össze. Jelenetős csökkenést figyeltünk meg a FABP-1, NFkB1 és Dkk-4 fehérjék szintjében. Azonban a PON1, BCL-2, Citokróm c, Foszfo-JNK Pan, PON2, Tioredoxin-1, Foszfo-HSP27, HSP60, HSP70, Foszfo-p53, ADAMTS1, Cited-2, p21/CIP1, szénsav-anhidráz IX, IDO és COX-2 fehérjék pozitív jelet adtak a membránon, de nem mutattak jelentős változást. Míg a PON3, Foszfo-p38a, SIRT2, SOD2, HIF-1 alfa, HIF-2 alfa és p27 fehérjék szintje jelentősen emelkedett.

6. táblázat Progesztogén kezelés hatása a stressz fehérjékre bodorkában. A 26 vizsgált fehérjét biológiai funkciójuk szerint csoportosítottuk (első oszlop). A fehérjék azonosítóit a második és a harmadik oszlop mutatja. A negyedik és az ötödik oszlop a fehérje szekvencia egyezését és a fehérje azonosítását [%] mutatja a humán és a zebradánio fajok összehasonlításával, az adatokat a BLAST on-line adatbázisából származtak. Az utolsó oszlop mutatja a szteroid kezelés hatására megfigyelt változás mértékét [%] és irányát a kontroll csoporthoz képest. A variációs koefficiens (CV) a következő formula alapján számoltuk: $C_{kezelt}/C_{kontroll} \cdot 100$.

Biológiai funkció	Gyakori név	Pubmed azonosító	Szekvencia egyezés [%]	Azonosítás [%]	CV [%]
Metabolizmus	FABP-1	P00505.3	99	65	-42,0
	PON1	P27169.3	99	49	-2,3
	PON3	NP000931.1	99	49	43,3
Apoptózis	BCL-2	P10415.2	99	68	13,8
	Citokróm c	NP061820.1	100	85	-4,8
	Foszfo-JNK Pan	AAC50127.1	99	87	-15,1
	Foszfo-p38a	P46108.2	100	86	40,6
Antioxidáns kapacitás	PON2	Q15165.3	94	55	-13,8
	Tioredoxin-1	AAF86466.1	97	63	-8,3
	SIRT2	AAK51133.1	94	66	482,6
	SOD2	AAH16934.1	100	85	81,5
Stressz	HIF-1 alfa	Q16665.1	99	57	35,4
	HIF-2alfa	NP001421.2	63	55	39,9
	Foszfo-HSP27	P04792.2	93	58	17,3
	HSP60	P10809.2	96	87	8,4
	HSP70	P08107.5	100	86	-13,0
	NFKB1	CAB94757.1	99	56	-40,8
	Foszfo-p53	BAC16799.1	84	57	8,1
Sejt differenciáció, proliferáció	ADAMTS1	AAF15317.1	93	60	16,1
	Cited-2	P05549.1	100	56	0,9
	Dkk-4	Q9UBT3.1	90	51	-63,7
	p21/CIP1	Q9BXP2.1	87	38	-20,2
	p27	BAA25263.1	52	60	111,7
Katalitikus enzimek	Szénsav-anhidráz				
	IX	EAW58359.1	93	38	28,4
	IDO	AEF30540.1	90	45	23,7
	COX-2	P35354.2	93	57	8,4

6 Megbeszélés és következtetések

6.1 Progesztogének hatása a nagy mocsári csiga reprodukciójára és embrionális fejlődésére

Vizsgálataink célja az volt, hogy megismerjük a 10 ng/L progesztogén keverékkel történő kezelés hatását olyan vízi nem-célszervezeten, mint a nagy mocsári csiga, különös tekintettel az idegrendszeri változásokra, a reprodukcióra és az embriogenezisre. Vizsgálataink során a választott hormonkoncentráció (10 ng/L) a környezetben is megtalálható koncentráció érték volt, vagyis laborkísérleteink modellezték a lehetséges környezeti hatásokat és az általuk okozott változásokat. Annak ellenére, hogy milyen széles körben használják a progesztogéneket a humán gyógyászatban, kevés információval rendelkezünk arról, hogy a természetes vizekbe kerülve, biológiai aktivitásukat megőrizve, mint ED-ok, milyen komplex hatást fejtenek ki a vízi szervezetekre. Vizsgálataink során különböző *in vivo* és *in vitro* biológiai tesztet végeztünk el, melyekben a hormonszennyezés szülőkre (GnRH-szerű peptidek expressziója, spermium szám és petesejttermelés, VTG tartalom, petezsák minőség) és az utódokra (embrionális sejtosztódás időablaka, AEC, hexóz felhasználás) kifejtett hatásait tártuk fel, kimutatva a potenciálisan káros hatású progesztogének új, eddig ismeretlen aspektusait.

Progesztogén-indukálta élettani változások a felnőtt egyedekben

A VTG szintézis a hexózek és az aminosavak elérhető mennyiségétől függ [78,79,81], összhangban azzal a ténnyel, hogy a reprodukció feltétele az általános tápláltsági állapotban bekövetkező pozitív változás. A legtöbb tojásrakó fajban a VTG-szerű fehérjék és a VTG olyan proteinek prekurzorai a petesejtben, melyek biztosítják az embriogenezishez szükséges energia tartalékot (vitellinek). *L. stagnalis*-ban ilyen ismert, vitellin típusú molekula a petesejt-ferritin [61,73,139], de egyéb tüdőscsigákban, pl. *Helix aspersa*-ban [140], *Helisoma duryi*-ben [141], vagy *Planorbarius corneus*-ban [139] is leírtak petesejt vitellineket. Érdekes megfigyelés, hogy a petesejt-ferritin expressziója csökkent xenoösztrogén (TBT) kezelés hatására *L. stagnalis*-ban [61], ellenben egy másik tanulmány szerint a petesejt-ferritin előanyagának, a VTG-szerű fehérjének mennyisége 14 napos TBT kezelés után emelkedett, 28 napos kezelés után viszont csökkent egy másik édesvízi csigafajban (*Valvata piscinalis*) [84]. Eredményeink szerint a középbél mirigyben a VTG-szerű

fehérje mennyisége szignifikánsan emelkedett a 21 napos kezelési periódus végére, összhangban a harmadik héten megfigyelt emelkedett petesejt termeléssel. Giusti [61] szerint a petesejt-ferritin expressziója a 21 napos progesztogén típusú CPA kezelésben ($2 - 50 \mu\text{g/L}$) nem változott jelentősen *L. stagnalis*-ban. Ez a megfigyelés eltér az általunk kapott eredményektől, amelyek a természetben is lehetséges szituációt, azaz egy progesztogén keverék hatását írják le. Az eltérő változás a vitellin típusú és a VTG-szerű fehérjék szintjén is bekövetkezhet, háttérében az alkalmazott, eltérő koncentrációk (10 ng/L és $2 - 50 \mu\text{g/L}$), valamint az eltérő progesztogén hatóanyagok állhatnak. Egyéb progesztogének hatását a csigák VTG-szerű fehérjeire ezidáig nem vizsgálták. Más gerinctelenek közül a közönséges bolharákon (*Gammarus fossarum*) figyelték meg fokozott VTG szintézist 21 napos szteroid hormon (1 és $100 \mu\text{g/L}$ ekdiszteroid és juvelilis hormon keverék) kezelést követően [74]. Összegezve, eredményeink azt mutatják, hogy ellentétben a gerincesekkel, a puhatestűekben a VTG-szerű fehérje mérése alkalmas módszer lehet a progesztogén szennyezések jelzésére már az átlagos környezeti koncentrációban is.

Célul tűztük ki annak vizsgálatát, hogy vajon a DJ-1 védő fehérje is alkalmas-e a progesztogén szennyezés kimutatására. Ez a molekula a C56 peptidáz protein család tagja, antioxidáns, onkogén, neuroprotektív szerepét mind gerinctelen [87,88,89,90,91,92], mind gerinces [93,94,95,96] fajokban leírták, de szintjének változását ED kezelésben eddig még nem vizsgálták. Eredményeink szerint a 21 napos kezelés 7. napján mind az agyban, mind a középbél mirigyben csökken a DJ-1 fehérje szintje, azonban ez a szignifikáns különbség a 21. napra eltűnik. Ezek az eredmények korrelálnak a lerakott peték számában és a petezsák minőségben kapott adatokkal, ahol szintén az első héten láttunk szignifikáns csökkenést a kezelt csoportban. A lerakott peték száma a harmadik hétre jelentősen emelkedett, a petezsákok minősége pedig javult. Eredményeink arra utalnak, hogy a DJ-1 mennyisége az állatok életfolyamataiban bekövetkezett valós változás hatására csökken és a progesztogén szennyezés korai kimutatására alkalmas jelzőmolekula lehet, habár mennyisége hamar visszaáll a fiziológiás szintre.

Vizsgáltuk a progesztogének hatását a reprodukció szabályozásában, központi idegrendszeri szinten. Feltérképeztük a CNS-ben található GnRH-immunopozitív sejtek elosztását. Egy korábbi, *L. stagnalis*-on végzett tanulmányban leírtakkal összehasonlítva [123], ugyanattól a gyártótól származó antitest alkalmazását követően több idegdúcban találtunk immunopozitív jelölődést. Ennek lehetséges okai pl. az

eltérő technikai feltételek (konfokális mikroszkópia, vastagabb szeletek megfigyelése, eltérő elsődleges antitest hígítás és különböző másodlagos antitest) alkalmazása, esetleg az antitest tisztítás fejlődése. A korábbi és az általunk megfigyelt eredmények között hasonlóság volt abban, hogy a legintenzívebben jelölődő régió a L/RCG laterális lebenye, valamint hogy a L/RBG és LPG-ban nem láthatók GnRH-immunpozitív sejtek, illetve rostok. Ezzel szemben, eltérés mutatkozott a L/RPIG és L/RPeG jelölődésében, ugyanis a korábbi tanulmánnyal ellentétben, mi nem figyeltünk meg immunpozitívítást a L/RPIG-ban, azonban a L/RPeG-ban igen. A L/RPeG-ban mind az 5 immunpozitív sejtcsoport szimmentrikusan jelölődött a bal és a jobb oldalon. Az általunk megfigyelt sejteloszlás az egyes ganglionokban jobban hasonlít a *Helisoma trivolvis*-ban található GnRH-szerű fehérjét tartalmazó sejtek lokalizációjához (a LPG kivételével), mint a *L. stagnalis*-ban korábban leírtakhoz [123]. *Helisoma trivolvis*-ban és *Haliotis asinina*-ban egyaránt a VG jelölődik legintenzívebben [123,142,143]. *L. stagnalis*-ban ugyanakkor kevesebb sejt jelölődött a VG-ban, de azok közepes méretű és óriás neuronok voltak. Az előző tanulmányokhoz hasonlóan, a GnRH-immunpozitív rostok a bél idegen és az ivarszervi idegen keresztül futnak ki a VG-ból. Eredményeink szerint a VG VD1 és a RPG RPD2 óriásneuronjai GnRH immunpozitív jelet adtak, azonban más jelölt sejtekkel ellentétben, ezek intenzitása független volt a kezeléstől. Irodalmi adatok szerint ezek a sejtek 3-féle gént expresszálnak, amelyek 4-féle prekursor proteint kódolnak [144]. Ebből a 4 prekursor proteinből poszttranszlációs módosulással jön létre számos neuropeptid, amelyekkel ez a két óriásneuron többek között például a szív működés szabályozásában vesz részt. Mivel az említett négyből kettő prekursor protein aminosav sorrendje és az általunk alkalmazott GnRH-antitest immunogén szekvenciája 5%-ban mutat homológiát, elképzelhető, hogy ezekben az óriás neuronokban olyan fehérjét detektálunk, amelyek többek közt GnRH-szerű fehérjék prekursoraiként is szolgálnak. Ez magyarázná a kezeléstől független, állandó immunjelet is.

Pettyes éti csigában (*Helix aspersa*) a bél ideg, a szívburok beidegzése mellett, az ovotestist is behálózza. Antkowiak és Chase [145] kimutatták, hogy erős pozitív korreláció van az ovotestisben található érett petesejtek száma és a bél ideg ovotestist behálózó ágán végigfutó spontán afferens akciós potenciálok frekvenciája között. Feltételezik, hogy az ovotestisben tömegesen megérő petesejtek feszítik a mirigyvégkamrák falát, ami akciós potenciálokat vált ki a falban fekvő

mechanoszenzoros idegvégződéseiben. A létrejövő tónusos jel hatására következik be az ovuláció. *L. stagnalis*-ban szintén leírták, hogy a bél ideg, ami behálózza a nőstény reprodukciós rendszert, a peterakási viselkedés négy fázisából kettőben is meghatározó szerepet játszik (2. fordulás [turning] és 3. peterakás [oviposition]; [146,147,148]).

Hermann és mtsai [147] *L. stagnalis*-ban leírták, hogy a bél ideg nőstény traktusból eredő ágainak elektromos ingerlése a RPG-ban elhelyezkedő RPeN motoros neuronok ingerületét okozza. Ez a neuron csoport szabályozza a peterakási viselkedés második, fordulási fázisát. A harmadik, peterakás fázisba történő átmenetet biztosítja a CDCH gátló hatása ezen a sejtcsoporton. A CDCH-t a L/RCG CDC klaszterében elhelyezkedő sejtek termelik, ez a hormon felelős a nőstény reprodukció szabályozásáért és a peterakásért. van Minnen szerint [149] IHC technikával vizsgálva a L/RCG-ból kiindulva 2 fő irányt mutat a hormont tartalmazó axonok projekciója. Az egyik a cerebropleurális kapcsolaton keresztül a L/RCG-ba és VG-ba futó út, amely a RPG-ból a belső és külső köpeny idegeken keresztül, a VG-ból pedig az ivarszervi, a bél és a végbél idegeken keresztül vetülnek ki. A másik a cerebropedális kapcsolaton keresztül a RPeG-ba vetülő út, ahol csak a neuropil jelölődik. A LPeG-ban pedig kevés axon jelölődik [149]. Eredményeink szerint a GnRH immunjelölés nem különbözött a kontroll és a 10 ng/L progesztogén kezelt csoport között azokon a részekben, ami a nőstény reprodukciós szabályozással hozható összefüggésbe (az ivarszervi és bél idegek kifutása a VG-ból, a neuropil jelölődése a L/RCG-ban, illetve a L/RPeG-ban). A L/RCG-ban és L/RPeG-ban azonban gyengült a GnRH-szerű peptideket expresszáló sejtek jelölődésének intenzitása. Az intenzitás csökkenés érintette az elülső leánysejtjeit a L/RCG-ban, valamint a PeIb klaszter sejtjeit a RPeG-ban. Mivel ezek a területek felelősek a hím reprodukció szabályozásáért, érintettségük összefüggésbe hozható a progesztogén kezelésben megfigyelt jelentősen csökkent spermium számmal. Gerinces állatokban és emberben is vizsgálták az általunk alkalmazott progesztogének hatását a spermiumok számára, mozgási aktivitására és megtermékenyítő képességére. Megállapították, hogy PRG kezelés (300 ng/L, 1 hét) csökkentette a spermiumok motilitását tűzcselében, LNG kezelés (65 ng/L, 45 nap) csökkentette a spermiumok számát tuskés pikóban [36,150,151], valamint megfigyelték, hogy LNG-rel (1, 10, 100 ng/mL) kezelt humán spermiumokban dózisfüggő módon csökkent a mozgási képesség és a petesejtrel való fúziós kapacitás [152].

A progesztogén kezelés végén mért VTG szint jól korrelált az ugyanekkor a kezelt csoportban megfigyelt emelkedett petesejt számmal, mely ugyan csökkent az első héten, de a harmadik hét végére a kétszeresére emelkedett a kontroll csoporthoz képest. Eredményeinkhez hasonlóan más szerzők a progeszteron receptor agonista VZ-nal kezelt (25 ng/L, 21 nap) *L. stagnalis*-ban azt figyelték meg, hogy az első héten csökkent, a harmadik héten viszont emelkedett a lerakott tojások száma a kezelt állatokban [60]. Ugyanakkor irodalmi adatok szerint a 21 nap hosszú, külön 10 ng/L GES, 10 ng/ PRG, vagy 100 ng/L DRO hormonnal történő kezelés nem volt hatással a tüzcsale petesejt termelésre, azonban 100 ng/L GES jelentősen csökkentette azt [11,152]. Tüzcselén végzett számos tanulmány demonstrálta, hogy a LNG dózis-függő módon (0,8 ng/L koncentrációtól 100 ng/L-ig) csökkentette a petesejt termelést [11,69]. A megfigyelések közti különbség magyarázható az eltérő kísérleti állatokkal (gerinctelenek és alacsonyabb rendű gerincesek), valamint az eltérő kísérleti felépítéssel (a keverékkel ellentétben csak egyféle hormonnal történő kezelés) és koncentrációkkal. A petesejt termeléshez hasonlóan a petezsákok minősége is romlott a kezelt csoportban az első héten. Az általunk kidolgozott petezsák értékelő rendszerhez hasonlókat korábban nem publikáltak. Ugyan leírtak változásokat egyes ED-ok hatására a tojásban, ill, a petezsák rakás tendenciájában [60,62], amely adatokon alapulnak az általunk választott vizsgált paraméterek (poliembriók és halott embriók száma), de eddig nem foglalták össze azokat egy kompakt rendszerben.

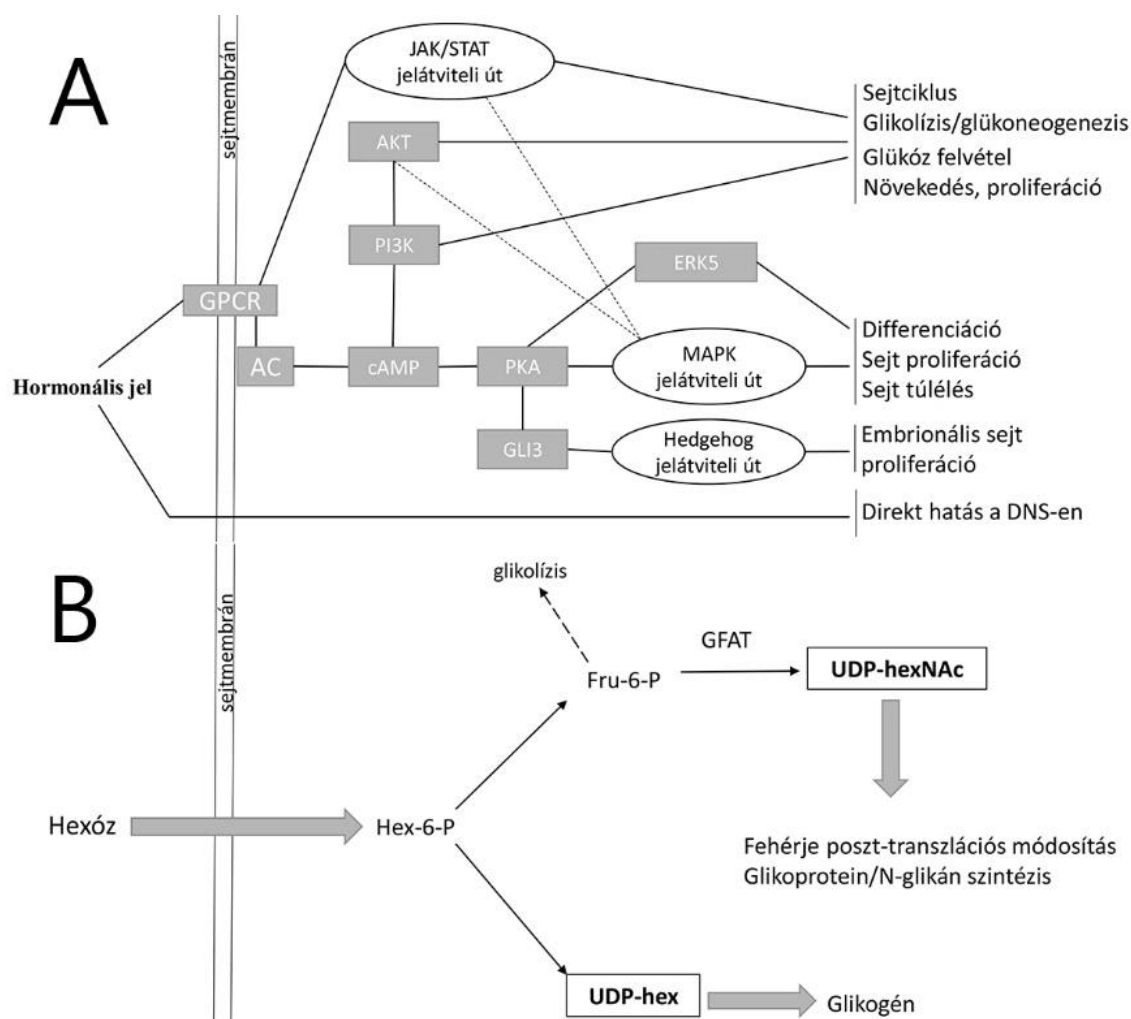
Eddigi eredményeink szerint a *L. stagnalis* szenzitív a vízi környezetben egyforma koncentrációban (10 ng/L) jelen lévő progesztogének keverékére. A koncentráció összeadódás (CA) modell szerint, mikor a keverékben alkalmazott összetevők egymástól függetlenül is hatnak, a keverék által kiváltott hatás mértéke additív. Ráadásul a keverék fiziológiai hatása eltér alacsony és magas koncentrációban. Christen és mtsai [153] leírták, hogy a két- és háromkomponensű ösztrogén keverékek szinergista módon hatnak magas (EC50) és antagonisták módon alacsony (EC10) koncentrációban. Az általunk használt progesztogén keverékben jelen van a PRG, a PRG-ből származó DRO, amelyek anti-androgén hatással rendelkeznek. Emellett a LNG és a GES a tesztoszteronból származnak, részben androgén aktivitást mutatnak [9]. Ezek alapján érdemes lenne vizsgálatot végezni annak felderítésére, hogy az általunk használt hormonkeverék mely komponensei milyen módon hatnak a különböző (EC10, EC50) koncentrációkban (erősítik, vagy

gyengítik egymás hatását), valamint ezáltal kapnánk eredményt arról, hogy mely összetevők felelősek az általunk a csigában megfigyelt változásokért.

Progesztogén-indukálta változások a kezelt szülők utódaiban

A *L. stagnalis* szülők vizsgálata során megfigyelt változások felvetették a gondolatot, hogy a szülők progesztogén kezelése hatással lehet a tojásokat érintő hormonális jelátvitelre és azok molekuláris összetételére. A hormonális szignálok képesek hatni a sejtciklusra direkt, vagy indirekt módon (differenciálódás, proliferáció és életképesség), valamint a hexóz metabolizmusra a G-protein kapcsolt receptor (GPCR)-AC-cAMP-PKA-MAPK útvonalon [154,155], a GPCR-AC-cAMP-PI3K-AKT útvonalon [78,156], a GPCR-JAK/STAT útvonalon [154,157] illetve a GPCR-AC-cAMP-PKA-GLI3-Hedgehog útvonalon [157,158] keresztül is (**23A ábra**). Az 5.1.3 fejezetben részletezett végpontok (sejtosztódás, AEC, hexóz felhasználás és redox státusz) egyikét sem vizsgálták korábban szélesebb értelemben ED, szűkebb értelemben progesztogén kezelések során. A tojás képzés és annak összetétele a szülőktől függ és meghatározza az utód életképességét [159]. Figyelemre méltó az a megfigyelésünk, hogy az embrionális fejlődés korai szakaszában a sejtosztódás ideje rövidült, a progesztogén keverékkel kezelt szülők zigótái gyorsabban érték el a 8 sejtés fázist, ugyanakkor a végső kikelés nem történt meg hamarabb a kontroll csoporthoz képest. Az egy-sejtés zigótákban a citoplazma AEC szintje, ami a metabolikusan rendelkezésre álló, adenin nukleotidokban tárolt energia szintjét jelzi, nem mutatott szignifikáns különbséget a két csoport közt. Ezzel szemben az UDP-hex szint emelkedett volt, így az UDP-hexNAc/UDP-hex arány szignifikánsan lecsökkent azokban a zigótákban, amelyek progesztogén kezelt szülőktől származtak. Irodalmi adatok alapján ismert, hogy ez az arány a citoplazmában lévő hexóz felhasználásától függ [160,161,162,163,164] (**23B ábra**), amely a glikogén szintézisben játszik fontos szerepet. A hexóz a sejt citoplazmájába kerülve hex-6-P-tá alakul, amiből a sejt energia státuszától és hexóz többletétől függően UDP-hex képződik és glikogén szintetizálódik [71,80]. A glikogén elraktározott energia forrásként szolgál a fejlődő embrió számára. Ha a sejt megfelelő energia állapotban van, az anabolikus folyamatokat szabályozó enzimek működése fokozódik és megindul a glikogén szintézis. Habár közvetlenül a glikogén szintet nem vizsgáltuk, az emelkedett UDP-hex szint látszólag arra utal, hogy a kezelt szülőktől származó zigóták több glikogént

termelnek, mint a kontroll szülőktől származók. Viszont a glikogén szintézishez energia szükséges és az AEC arány nem tért el a kontroll és a kezelt szülőktől származó sejtekben. Figyelembe véve, hogy a hormonális szignálok a GPCR-AC-cAMP-PI3K-AKT kaszkádon keresztül hatva blokkolják a glikogén-szintáz kináz 3 (GSK3) enzim működését [165,166,167], az emelkedett UDP-hex szint magyarázata inkább az, hogy a glikogén szintézis megáll, emiatt az UDP-hex akkumulálódik azokban az egy-sejtes zigótákban, amelyek kezelt szülőktől származnak. Ezzel párhuzamosan a GPCR-AC-cAMP-PI3K-PIP3-PDK1 rendszer [155] felerősíti a hexóz felvételt (**23B ábra**), így a hexóz metabolizmus nem sérül. Wells és mtsai [168] szerint az UDP-hexNAc készlet közvetlenül függ a hexóz koncentrációtól. Az UDP-HexNAc a hexózamin-bioszintézis útvonalon keresztül termelődik és a sejtek a fehérjék post-transzlációs módosításában használják fel és/vagy glikoprotein, vagy N-glikán szintézisre termelik. Az utóbbi szintén tápanyag forrásként szolgál a fejlődő embrió számára [169], ezért feltételezhető, hogy az embriók tápanyagellátása nem sérül a szülők hormonkezelése során.



23. ábra (A) A szignalizációs molekulák és útvonalak sematikus ábrázolása, amelyek a sejt-ciklus és a metabolizmus szabályozásában vesznek részt. GPCR: G-protein kapcsolt receptor; AC: adenilát-cikláz; cAMP: ciklikus-adenozin monofoszfát; PI3K: foszfatidil-inozitol 4,5-bifoszfát 3-kináz; AKT: RAC-szerin/treonin protein kináz, vagy protein-kináz B; PKA: protein-kináz A; GLI3: cink ujj fehérje GLI3, a GLI fehérjecsald C2H2-típusú cink ujj fehérje alosztály tagja; ERK5: extracelluláris-szignál-szabályozó kináz 5; JAK/STAT: Janus kináz (JAK) és két transzkripciós szignál transzduktor és aktivátor; MAPK: mitogén aktiválta protein kináz; Hedgehog szignalizációs útvonal: ez a jelátviteli út Hedgehog szignalizációs fehérjékből áll, amelyek továbbítják a megfelelő fejlődéshez szükséges információt az embrionális sejtek felé. (B) A hexóz felhasználás sematikus megjelenítése a citoplazmában. Hex-6-P: hexóz-6-foszfát; Fru-6-P: fruktóz-6-foszfát; UDP-hexNac: uridin-difoszfát N-acetilhexózamin; UDP-hex: uridin-difoszfát hexóz; GFAT: glutamin:fruktóz-6-foszfát amidotranszferáz enzim.

A tojásban lévő szikanyag egy dinamikusan változó közeg, részt vesz az embrionális fejlődés támogatásában azáltal, hogy a szükséges tápanyagokat és a megfelelő környezetet biztosítja a zigótának minden egyes fejlődési stádiumban. Eredményeink szerint ennek az embrió körülvéő közegnek a kvalitatív összetétele nem változott a szülők progesztogén kezelésének hatására (nem detektáltunk új/más

molekulákat), valamint kezdetben nem különböztek a kontroll és a kezelt csoportok tojásai az egyes metabolitok arányát tekintve (redox státusz és AEC). A redox státuszt részben a glikolízis enzimei befolyásolják, azáltal, hogy a NADH/NAD⁺ arány egyensúlyi állapotát beállítják. Ez az arány emelkedő tendenciát mutatott a *L. stagnalis* embriógenezise során, de nem volt szignifikáns különbség a kontroll és a kezelt csoport tojásainak redox státusza között. Ez alapján arra következtetünk, hogy a szülők progesztogén kezelése nem volt hatással a tojások glikolitikus enzimrendszerére. Azonban a glutation (GSH) – oxidált glutation (GSSG) molekulák aránya jelentősebb redox pufferrendszerként működik, mint a NADH/NAD⁺ pufferrendszer, mivel inkább a GSH pufferhatása dominál redox folyamatokban [137,138]. Szikanyag méréseink során csak a redukált GSH formát tudtuk stabilan detektálni, oxidált formáját (GSSG) azonban nem, emiatt csak a NADH/NAD⁺ arányt elemeztük.

Ezzel szemben a szikanyag AEC értéke jelentősen emelkedett értéket mutatott a kezelt csoportból származó csigák tojásaiban az embriógenézis félidejénél, 96 óránál. Az emelkedett AEC arány arra utalhat, hogy a progesztogén kezelt szülők több hexózt juttattak a tojásaikba a kontroll csoport felnőtt állataihoz képest. A szikanyagban jelen lévő hexóz többlet a fejlődésnek ebben a stádiumában egyrészt nagyobb energia bázisként szolgálhat a közelgő metamorfózishoz, másrészt pedig az utód életképességének javítására hivatott, mint az utód tolerancia/adaptáció képességének erősítése a szteroid szennyezett környezetben.

Összegezve a fent leírtakat elmondható, hogy a *L. stagnalis* érzékeny a progesztogén szennyezésre már az általános környezeti koncentrációban is. Eredményeink szerint progesztogén keverék hatására változtak mind a szomatikus, mind a molekuláris paraméterek, valamint az utódokra is hatással volt a szülők progesztogén kezelése, ugyanis a kezelt szülők több hexóz jelenlétét biztosították a tojások szikanyagában.

6.2 Progesztogének okozta fiziológiai és molekuláris változások bodorkában

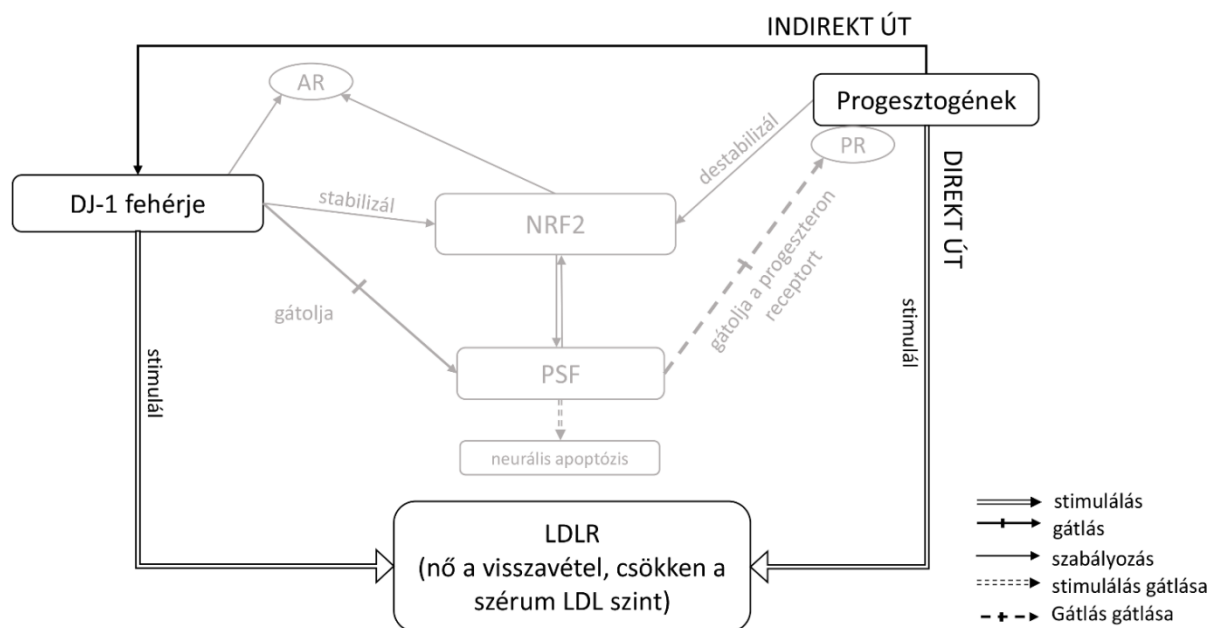
A progesztogén kezelés minden csoportban hasonló tendenciájú hatást mutatott a halak testsúlyára és a testhosszára, azonban ezek statisztikailag nem voltak jelentős változások. Ezt okozhatta az alkalmazott relatív rövid expozíciós idő. Ugyanakkor, a VSI szignifikáns emelkedése, a GSI szignifikáns csökkenése a kezelési koncentráció növelésével végig kimutatható volt, a MSI azonban az 500 ng/L kezelt csoportban már

nem mutatott szignifikáns eltérést a kontroll csoporttól. Fontos megemlíteni, hogy ezekhez a tesztekhez kevert nemű csoportokat használtunk, mivel a hím és nőstény egyedek megjelenésükben nem különíthetők el. Eredményeinkhez hasonlóan, egy korábbi tanulmány [36] szintén vese hipertrófiát állapított meg ≥ 40 ng/L LNG kezelés hatására nőstény tuskés pikóban. Azonban 25 ng/L LNG kezelésben mind hossz, mind súlynövekedést találtak nőstény tűzcselékben [8]. Zucchi és mtsai [19] szignifikáns csökkenést láttak a GSI értékben 5000 ng/L DRO és 400 ng/L PRG kettős kezelés hatására zebradánióban, de DeQuattro és mtsai [152] tűzcselében 1000 ng/L PRG kezelésben nem tapasztaltak változást a GSI értékben. Az is ismeretes, hogy a GSI szezonálisan változik a Balatonban élő keszegfélékben [170]. A márciusban alacsony GSI érték áprilisban ugrásszerűen megnövekszik, júliusban lecsökken, majd a nyári nyugalmi időszakot követően ősszel lassan növekedni kezd, november végére pedig eléri a tél folyamán lecsökkenő értéket. Kísérletünket akkor végeztük, amikor a nyári nyugalmi időszakból lassú növekedésbe kezdtek a gonádok. Ez okozhatta a kontroll csoport magas szórását, azonban az eredmények egyértelműen mutatják, hogy az 500 ng/L progesztogén kezelés gátolta a gonádok lassú növekedését [170].

Az általunk használt DRO, LNG és PRG keverék VTG szintemelkedést indukált nőstény bodorkák májában, de csak a legmagasabb kezelési koncentráció (500 ng/L) alkalmazásánál tapasztaltunk a kontroll csoporthoz viszonyított szignifikáns emelkedést. DeQuattro és mtsai [152] csökkent VTG mRNS tartalmat mutattak ki tűzcselében 21 nap hosszú, 10 ng/L PRG kezelést követően. Zucci és mtsai [19] azt figyelték meg, hogy az egyedüli 50 ng/L DRO kezelés zebradánióban jelentősen csökkentette a máj VTG mRNS szintjét, viszont az állatokat 50 ng/L DRO és 4 ng/L PRG keverékével kezelve már nem volt kimutatható ez a hatás. Továbbá megfigyelték, hogy 500 ng/L DRO kezelés önmagában, és 40 ng/L PRG-vel kombinációban is jelentősen csökkentette a máj VTG mRNS szintjét. Ezzel szemben a plazma VTG szintje mindvégig változatlan volt az egyedüli DRO és a PRG-vel kombinációban történő kezelések során az említett koncentrációkban 14 napos kezelési periódusban. Más tanulmányok szerint tűzcsellében a plazma VTG szintjére a 0,5 és 5 ng/L LNG nem volt hatással, 25 ng/L LNG jelentősen növelte, de 100 ng/L LNG jelentősen csökkentette a plazma VTG szintet [8,11]. Továbbá 30 ng/L LNG kezelés *X. laevis*-ben sem okozott jelentős változást a VTG mRNS szintjében [12]. Az egymásnak ellentmondó irodalmi adatok és a saját eredményeink alapján arra következtethetünk, hogy a VTG, mint biomarker a progesztogén szennyezés jelzésére nem alkalmas

alacsonyabb rendű gerincesekben, mivel különböző változást mutat a szennyezés fajtája és koncentrációja függvényében, ráadásul csak nőstény egyedekben használható. Ezek miatt merült fel az igény egy új, progesztogén szennyezés jelzésére alkalmasabban használható biomarker felkutatására.

A DJ-1 fehérje és a szteroidok néhány közös támadásponttal rendelkeznek, ezért alternatívaként a DJ-1 fehérjét vizsgáltuk, mint a progesztogén szennyezés lehetséges jelzőmolekulája. Megfigyeltük, hogy a bodorkák agyában és májában található DJ-1 fehérje szintje progesztogén kezelés hatására szignifikánsan megnőtt már a legkisebb alkalmazott koncentráció esetén is, függetlenül a vizsgált nemektől. Mivel megfelelő érzékenységet mutatott a szennyezés jelzésére, így alkalmas és potenciális jelző molekulának tekinthető. Ugyanakkor, a szérum koleszterin és LDL-koleszterin szintjének parallel csökkenését figyeltük meg a kezelés hatására. Figyelembe véve a saját eredményeinket és azt, hogy korábban az LDLR-gén csökkent expresszióját, valamint a szérum koleszterin és LDL-koleszterin emelkedett szintjét figyelték meg DJ-1-géncsendesített sejtekben és DJ-1-génkiütött egerekben [102,104], elmondható, hogy a DJ-1 fehérje hat a koleszterin homeosztázisra halakban. Az LDLR expresszió serkentése által nő az LDL visszavétel (reuptake) a szérumból, így csökken az LDL-koleszterin szint. A progesztogének direkt módon stimulálják az LDLR expressziót. Feltételeztük továbbá, hogy a progesztogének direkt módon befolyásolhatják a DJ-1 fehérje expresszióját, ezáltal indirekt módon stimulálják az LDLR-kat, tovább erősítve a szérum LDL-koleszterin csökkenését (**24. ábra**). Ismert, hogy gerincesek esetében a szérum koleszterin, LDL-, HDL-koleszterin szintek és az LDLR expresszió függetlenek a nemtől. Megfigyeléseink alapján feltételezzük, hogy a DJ-1 indirekt módon befolyásolja a szérum koleszterin, HDL- és LDL-koleszterin szinteket, így az általunk alkalmazott kevert nemű mintacsoport estében is használható módszer a szennyezés okozta változások kimutatására. Összegezve, a DJ-1 alkalmasabb biomarker progesztogén szennyezés felmérésére, mint a VTG, amely inkább nőstény egyedekben mutat szignifikáns változást. Azonban, a DJ-1 használhatóságát, mint hatásos biomarkert vízi ökoszisztémák progesztogén szennyezésének kimutatásában, további kísérletekkel kell megerősíteni más fajokon is végzett vizsgálatok alapján.



24. ábra A progesztogének hatása a szérum LDL-koleszterin szintre. A progesztogének direkt és indirekt úton, a DJ-1 fehérjén keresztül képesek hatni az LDLR expresszióra. Ezáltal csökkentik a szérumban mérhető LDL-koleszterin szintet.

A sejtszintű hatások kimutatása céljából 26 stressz fehérje expressziójának változását vizsgáltuk progesztogén kezelés hatására. A fehérjék egy csoportjának expressziója, beleértve a HIF-1 alfa, HIF-2 alfa, PON3, Foszfó-p38a, SIRT2, SOD2, és a p27 fehérjéket, növekedést mutatott. A HIF-1 a hipoxia indukálta celluláris és homeosztatikus folyamatok fő szabályozója, számos gén transzkripció aktivitását befolyásolja, ezáltal hat az energia metabolizmusra, apoptózisra és más egyéb sejtfolymatokra, amelyek végeredménye a növekvő oxigénszállítás és a metabolikus adaptáció erősítése [171,172,173,174]. A PON3 fehérje emberben főleg a májban szintetizálódik, a véráramba kerülve kötődik a HDL-koleszterinhez. Ez a fehérje gyorsan képes hidrolizálni a lakton típusú molekulákat és hatékonyabban képes gátolni az LDL-koleszterin oxidációját, mint a PON1 fehérje [175]. A Foszfó-p38a, más néven mitogén-aktivált fehérje kináz (MAPK), a MAP kináz fehérje család tagja. A MAP kinázok számos biokémiai jelátviteli út integrációs pontjaként vannak jelen, a sejt folymatainak széles körében érintettek, például a sejt proliferációban, differenciációban, transzkripció szabályozásban és a fejlődésben. A Foszfó-p38a a sejtet ért különböző környezeti stresszhatásra és gyulladásos citokinek hatására aktiválódik [176,177]. A SIRT2 fehérje a deacetiláz fehérjecsalád tagja, az öregedési folymatok során a celluláris stressz elleni védekezésben van szerepe [178].

Eredményeink alapján bodorkában az NFκB1 és FABP-1 fehérjék szintje csökkent (down-reguláció). Az NFκB1 egy gyorsan ható elsődleges transzkripció faktor, amely minden sejttípusban megtalálható. Részt vesz a sejtek citokinekre és stressz általi stimulációra adott válaszában, valamint kulcs szerepet játszik a fertőzés által kiváltott immunválasz szabályozásában [179]. A FABP-1 fehérjének szerepe van a zsírsav felvétel, transzport és metabolizmus szabályozásában. Kötődik a koleszterinhez, ezáltal befolyásolja az *in vitro* koleszterin transzfert a plazma membrán és a mikroszómák között az acil-CoA koleszterin-aciltranszferáz általi koleszterin észterifikáció fokozásával [180]. A FABP-1 fehérjét leírták az adipózissal és inzulin rezisztenciával kapcsolatos anyagcsere betegségek biomarkereként is [181]. A trigliceridek függetlenül kötődnek a FABP-1 fehérjétől [182], azonban a szérumban FABP1 szint jól korrelál a hipertrigliceridémiával és az alacsony HDL koleszterin szinttel [181]. A FABP1 fehérje növeli a zsírsav transzportot, lipogenezist és a lipid transzportot.

Mindezek arra utalnak, hogy a progesztogén expozíció stresszként hat a bodorkára (Fosfo-p38, SIRT-2, NFκB1). Módosul az anyagcsere, melyhez alkalmazkodni törekszik az állat (HIF-1), a szignifikánsan kevesebb koleszterin termelés a transzfert és észterifikációt fokozó FABP-1 csökkent expresszióját váltja ki, a PON3 fokozott expressziójával pedig a szignifikánsan kevesebb LDL-koleszterin oxidációját gátolja a szervezet. A HSP fehérjecsaládba tartozó fehérjéknél nem figyeltünk meg változást a kontroll és a kezelt csoport között. A krónikus progesztogén kezelés alkalmazásakor kapott eredmények összhangban állnak a korábban publikáltakkal és megerősítik azon megállapításokat, hogy a HSP fehérjék adaptálódnak a külső környezeti faktorokhoz, habár akut kezelés esetén növekszik a szintjük, krónikus kezelés esetén visszatér a normál szintre [183,184].

Összességében a progesztogén kezelések, melyek az édesvizek átlagos és lehetséges szennyezettségét is reprezentálják, szignifikáns morfológiai (MSI, GSI, VSI) és molekuláris változásokat (VTG, DJ-1, koleszterin, LDL-koleszterin szintben és egyes stressz fehérjék expressziójában) okoztak a tesztállatokban.

7 Összefoglalás

A folyók és tavak különböző szteroid típusú gyógyszermaradványokkal történő szennyezettsége általános probléma világszerte. A fogamzásgátló tabletták hatóanyagai, a progesztogének, ilyen szteroid típusú molekulák, melyek a széleskörű felhasználás és a nem tökéletes szennyvíztisztítási eljárások következményeképp kerülnek a természetes vizekbe. Habár az elmúlt években számos tanulmány foglalkozott az egyes progesztogének vízi állatokon kifejtett hatásával, csak néhány tanulmány mutatott be valós környezeti expozíciós modellt, reprezentatív környezeti szennyezettségi koncentrációt és hormon keveréket alkalmazva. A progesztogének csoportja a fogamzásgátlók fejlődésével manapság már olyan molekulákat foglal magába, melyek különböző affinitással kötődnek az egyes receptorokhoz, emellett egyre potensebben hatnak a PR-on. A keverékben történő környezeti megjelenésük felveti a kérdést, hogy vajon erősítik, vagy gyengítik egymás hatását az expozíciónak kitett vízi állatokban.

Közép-Európa legnagyobb sekélyvizű tavanak, a Balatonnak vízgyűjtő területe, ahol a progesztogének jelenlétét munkacsoportunk egy korábbi tanulmányban kimutatta [53], többek között a nagy mocsári csiga és a bodorka élőhelye. Ezeket a fajokat választottuk gerinctelen és gerinces tesztállatként kísérleteinkhez, melyekben négy progesztogén keverékét alkalmazó vizsgálati felépítést követtünk annak megértése érdekében, hogy hogyan reagálnak ezek a nem-célszervezetek az ilyen, a környezetben is előforduló szituációra hosszabb távon.

Kísérleteinkben a gerinctelen és a gerinces vízi állatok egyaránt érzékenyek bizonyultak a progesztogén szennyezésre. Csigában megfigyeltük a reprodukív rendszer károsodását az általános környezeti koncentrációban alkalmazott progesztogén keverék hatására, központi idegrendszeri és perifériás szinten egyaránt. Ebben a hermafrodita fajban a krónikus progesztogén terhelés eltérő hatást váltott ki a hím és a nőstény reprodukciós rendszer szabályozásában. A nőstény reprodukcióhoz kapcsolható agyi területeken a GnRH immunpozitivitás nem változott progesztogén keverékkel történő kezelés hatására, a hím reprodukcióhoz köthető területek jelölődésének intenzitása azonban csökkent a CNS-ben. Perifériás szinten az ivarsejtek száma részben ennek megfelelően változott: a spermium szám jelentős csökkenését, azonban a lerakott petesejtek számának emelkedését figyeltük meg a kezelés végén a kontroll csoporthoz képest. A petesejt szám emelkedés hátterében álló okok

felderítéseként további vizsgálat lehet a PR lokalizáció meghatározása a *L. stagnalis* CNS-ben, valamint a nőtény reprodukcióhoz kapcsolható szervekben egyaránt. A kezelt szülők utódai a korai fejlődési stádiumban olyan, a kontroll csoporttól eltérő, metabolikus paraméterekkel rendelkeztek, amelyek a szénhidrát anyagcserét érintették. Érdemes lenne vizsgálni a szülői progesztogén kezelés későbbi hatásait egy több-generációt érintő kísérletben a tolerancia/adaptáció megfigyelése érdekében.

A progesztogén kezelés bodorkában is változást okozott mind a szomatikus, mind a molekuláris paraméterekben. Ez esetben több kezelési koncentrációt is alkalmaztunk és azt tapasztaltuk, hogy az egyes testtömeg indexek (máj, gonád és vese esetében) a progesztogén keverék koncentrációjától függetlenül szignifikánsan változtak a kontroll csoporthoz képest. Molekuláris szinten a legmagasabb koncentrációjú progesztogén keverékkel kezelt állatok szérum koleszterin és LDL-koleszterin értékei, valamint számos, különböző biológiai funkciót ellátó fehérje (mint pl. a PON3, Phospho-p38a, SIRT2, SOD2, HIF-1 alpha, HIF-2alpha, p27 and NFkB1, FABP-1) jelentős változást mutatott. Mindezek arra utalnak, hogy a progesztogén terhelés stresszként hatott az állatokra és a módosult anyagcseréhez igyekezett alkalmazkodni a szervezet.

Megvizsgáltuk a VTG, a nőtényekben az ösztrogén szennyezés kimutatására általánosan alkalmazott biomarker használhatóságát progesztogén szennyezésben. Azt találtuk, hogy csigában már az átlagos környezeti koncentráció is jelentős változást eredményezett a VTG-szerű fehérjék expressziójában, de a bodorkában csak a legmagasabb kezelési koncentráció okozott változást a VTG szintben. Alternatívaként megvizsgáltuk a DJ-1 fehérje, mint egy nemtől független, környezeti változásokra érzékeny molekula alkalmazhatóságát progesztogén szennyezés kimutatására, alapozva a DJ-1 és a progesztogének közös molekuláris célpontjaira. A gerinctelen állatban ez a fehérje alkalmasnak bizonyult a szennyezés korai jelzésére, de krónikus kezelésben már nem tapasztaltunk jelentős eltérést a DJ-1 szintjében. A gerinces tesztállatban azonban potenciális jelzőmolekulának találtuk a krónikus progesztogén terhelésre, ugyanis a DJ-1 fehérje szintje, a VTG-nel ellentétben, már az átlagos környezeti progesztogén koncentrációban is jelentősen változott.

Vizsgálatink megerősítik, hogy az alacsony koncentrációjú progesztogén keverék is egy valós biológiai kockázatot jelent Közép-Európa legnagyobb sekélyvizű tavának vízgyűjtő területén jelenleg és a jövőben is. Mind a gerinctelen, mind a gerinces tesztállatokban megfigyelt eredményeink között számos olyan végpont

található, amely felhasználható egy további toxikológiai interakciós (koncentráció addíciós) kísérlethez, amivel meghatározható lenne, hogy az egyes progesztogének eltérő koncentrációban vegyítve milyen hatással vannak egymásra. Ezáltal megbecsülhető lenne, hogy a környezeti szennyezésben bekövetkező változások (fogamzásgátló felhasználási trendek változása, szennyvízkezelési eljárások átalakulása) milyen változásokat okozhatnak a vízi nem-célszervezetekben.

8 Új tudományos eredmények

- Vizsgáltuk a VTG szint változását progesztogén kezelésben és azt tapasztaltuk, hogy az általunk használt tesztállatokban ugyanolyan irányú változást, növekedést mutatott minden progesztogén kezelt csoportban, de a 10 ng/L koncentrációval történő hormon kezelésben csak a gerinctelen modellállatban volt pozitív prediktív értéke a szennyezés jelzésére.
- Alternatívaként egy új, eddig progesztogén szennyezés jelzésére még nem alkalmazott molekulát, a DJ-1 fehérje lehetséges biomarker szerepét vizsgáltuk. A halban nemtől függetlenül a krónikus progesztogén szennyezés jelzésére alkalmas és pozitív prediktív értéke van már az általános környezeti koncentráció tartományban is. A csigában csak az akut progesztogén szennyezés kimutatására alkalmas.
- A nagy mocsári csigában a hím és a nőstény reprodukcióra egyaránt hatással volt az átlagos környezeti progesztogén expozíció. Az ivarsejt termelésben ellentétes irányú tendenciát kaptunk, melyek egyéb molekuláris eredményeinkkel (VTG és GnRH) korreláltak. A kezelés végére a VTG koncentráció emelkedett, ezt tükrözte az emelkedett petesejt termelés. A CNS GnRH-immunpozitív jelölődése csökkent, mely a spermium számban megfigyelt csökkenéssel korrelált.
- Kidolgoztunk egy sikeresen alkalmazható petezsák értékelő rendszert, amely alapján összehasonlítható volt a kontroll és kezelt csoportok által rakott petezsákok minősége.
- Vizsgáltuk a progesztogén kezelt szülőktől származó utódok életképességét, fejlődését és azt találtuk, hogy az átlagos környezeti koncentráció hatással van azokra. Habár a tojás és az egy-sejtes zigóták kvalitatív molekuláris összetétele nem változott, az egyes metabolitok arányaiban szignifikáns eltéréseket tapasztaltunk és felgyorsult a sejtosztódás sebessége is. A progesztogén kezelt szülők több hexóz jelenlétét biztosították a szikanyagban.
- Bodorkában azt találtuk, hogy egyes testtömeg indexek jelentős változást mutattak már az átlagos környezeti koncentrációjú progesztogén kezelésben is (MSI, VSI, GSI). Molekuláris szinten megfigyeltük a koleszterin és az LDL-koleszterin szintek csökkenését, valamint számos különböző biológiai funkciójú fehérje jelentős változását.

9 Mellékletek

DOKTORI ÉRTEKEZÉS BENYÚJTÁSA ÉS NYILATKOZAT A DOLGOZAT EREDETISÉGÉRŐL

Alulírott

név: Zrínyi Zita

születési név: Zrínyi Zita

anyja neve: Zrínyi Katalin

születési hely, idő: Siklós, 1988. 01. 15.

Fogamzásgátló hatóanyag-maradványok által kiváltott szomatikus és molekuláris változások gerinctelen és gerinces vízi testállatokon című doktori értekezésem a mai napon benyújtom a(z) PTE Egészségtudományi Kar Egészségtudományi Doktori Iskola PR-6 Programjához/témacsoportjához.

Témavezető(k) neve: Dr. Pirger Zsolt

Egyúttal nyilatkozom, hogy jelen eljárás során benyújtott doktori értekezésemet

- korábban más doktori iskolába (sem hazai, sem külföldi egyetemen) nem nyújtottam be,
- fokozatszerzési eljárásra jelentkezésem két éven belül nem utasították el,
- az elmúlt két esztendőben nem volt sikertelen doktori eljárásom,
- öt éven belül doktori fokozatom visszavonására nem került sor,
- értekezésem önálló munka, más szellemi alkotását sajátomként nem mutattam be, az irodalmi hivatkozások egyértelműek és teljesek, az értekezés elkészítésénél hamis vagy hamisított adatokat nem használtam.

Dátum: 2017. november 09.

.....
doktorjelölt aláírása

Etikai engedély: VE-I-001/01890-10/2013



VESZPRÉM MEGYEI
KORMÁNYHIVATAL

ÉLELMISZERLÁNC-BIZTONSÁGI ÉS ÁLLATEGÉSZSÉGÜGYI IGAZGATÓSÁGA

Ügyiratszám: VE-I-001/01890-14/2013

Tárgy: Projektengedély,
állatkísérlet
engedélyezése

Ügyintéző: Dr. Holló Zsuzsa
Telefon: 88/579-277

Hiv. szám: -
Melléklet: -

HATÁROZAT

Dr. Pirger Zsolt (MTA Ökológiai Kutatóközpont **Balatoni Limnológiai Intézet**, 8237 Tihany, Klebelsberg K. u. 3) kérelmére, az MTA Ökológiai Kutatóközpont **Balatoni Limnológiai Intézet**, 8237 Tihany, Klebelsberg K. u. 3. szám alatti telephelyén az általa előterjesztett „Peptid-fehérje összetétel dinamikus változása a környezeti kihívásokhoz való adaptáció során vízi modellállatokban/Dynamic changes of peptide-protein composition in aquatic animals underlying adaptation to environmental challenges” - 109099 számú PD-OTKA pályázat című

**projekt keretében történő állatkísérletek végzését
2018. december 20-ig engedélyezem.**

Jelen határozat ellen, annak közlésétől számított 15 napon belül a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal Elnökének címzett (1024 Budapest, Keleti Károly u. 24.), de hatóságomhoz (Veszprém Megyei Kormányhivatal Élelmiszerlánc-biztonsági és Állategészségügyi Igazgatósága, 8200 Veszprém, Dózsa György út 33.) 2 példányban benyújtott fellebbezésnek van helye.

A döntés elleni jogorvoslati eljárás díja 10.000 forint. A jogorvoslati díj befizetését igazoló bizonylatot a fellebbezési kérelemhez csatolni kell.

A jogorvoslati eljárás díját a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal Magyar Államkincstárnál vezetett, 10032000-00289782-00000000 számlájára, átutalás vagy a számlára történő készpénzbefizetés útján kell megfizetni. A fizetési megbízás közlemény rovatában fel kell tüntetni a fellebbezéssel támadott döntés számát, a „jogorvoslati eljárási díj” megnevezést és az ügyfél adószámát, illetve adóazonosító jelét.

A fellebbezés elektronikus úton történő benyújtására nincs lehetőség.

Jelen határozatom a külön jogszabályokban előírt engedélyek birtokában, azokkal együtt jogosít fel a tevékenység végzésére!

INDOKOLÁS

A **dr. Pirger Zsolt** (MTA Ökológiai Kutatóközpont Balatoni Limnológiai Intézet, 8237 Tihany, Klebelsberg K. u. 3) által benyújtott, az MTA Ökológiai Kutatóközpont Balatoni Limnológiai Intézet, 8237 Tihany, Klebelsberg K. u. 3. szám alatt nyilvántartott intézményében végzendő „projekt engedély iránti kérelmét” az állatkísérletekről szóló 40/2013.

8200 Veszprém, Dózsa György u. 33.

Telefon: 88/579-260, Fax: 88/422-468, e-mail: veszprem-megye@nebih.gov.hu

(II. 14.) Korm. rendeletnek megfelelően felterjesztettem az Állatkísérleti Tudományos Etikai Tanács számára projektértékelésre.

Az eljárás során megállapítottam, hogy az MTA Ökológiai Kutatóközpont **Balatoni Limnológiai Intézet** az állatok védelméről és kíméletéről szóló 1998. évi XXVIII. törvény 26 paragrafusának megfelelően nyilvántartásba vett intézmény.

A projektben az intézmény részéről az állatvédelmi jogszabályok teljesülésének biztosításáért felelős személy **Dr. Takács Péter** okleveles biológus, a MÁB elnök **Dr. Erős Tibor** okleveles biológus, állatok jólétéért és gondozásának felügyeletéért felelős személy, **Dr. Pirger Zsolt** okleveles biológus és **Poller Zoltán** intézeti mérnök, valamint az intézményt ellátó állatorvos szakértő **Dr. Zoltán Levente**.

A projekt általános megvalósításáért, valamint a projektengedélyben foglalt feltételeknek való megfeleléséért felelős személy: **Dr. Pirger Zsolt** okleveles biológus

Az Állatkísérleti Tudományos Etikai Tanács VE-I-001/01890-5/2013 (KA-1488) számú projektértékelése az alábbi:

„A projektértékelés eredménye:

engedélyezhető az alábbi feltételekkel

1. A kérelemben említett, de nem ismertetett elektrofiziológiai kísérletek elvégzéséhez engedélymódosítási kérelem lesz szükséges.

2. A kérelmezőnek mentességi kérelmet kell pótlólag az Igazgatóságnak benyújtania vadon élő állat kísérletben való felhasználására tudományos indokok alapján. A mentesség megadása indokolt.

3. A nem szakmai jellegű összefoglaló újraírását javasoljuk az engedélyezendő projektre vonatkozó konkrétumok belefoglalásával és a jogszabályban előírt tartalmi elemekre kitérve.

A projektengedély az alább felsorolt kísérletekre és a megadott súlyossági besorolással érvényes:

Kísérlet megnevezése	súlyossági besorolás
1. maximum 14 hónapos hormonkezelés (fürdővízbe keverve)	mérsékelt
2. mesterséges hibernálás a fürdővíz lehűtésével	mérsékelt
3. befogás elektromos halászgéppel	mérsékelt

A projektengedély az alább felsorolt állatokra és tervezett állatszámra érvényes:

- bodorka (*Rutilus rutilus*) 300 db
- csapósügér (*Perca fluviatilis*) 300 db

Támogatott mentességi kérelmek: vadon élő állat befogására

Visszamenőleges értékelés szükségessége: nem szükséges

Ártalom-haszon elemzés: A tisztított szennyvízből az élővizekbe, így a Balatonba is bekerülő hormonszennyezés a táplálékláncon keresztül hatással lehet a vízben élő szervezetekre, és drasztikus változásokat okoz az arra érzékeny halak endokrin szabályozásában. A projekt a hormonterheléshez való alkalmazkodás (hibernáció és inaktív állapot) hátterében álló pestid-protein profilok vizsgálatát tűzi ki célul rutinszerű biokémiai, molekuláris biológiai és szövettani vizsgálati módszerek alkalmazásával. A tudományos haszon arányos a mérsékelt ártalommal.

A projekt - az engedély feltételeinek betartása mellett - megfelel a 40/2013. (II.14) Korm. rendelet 42. § (1) bekezdés a) -c) pontjaiban foglalt feltételeknek.”

Az ÁTET projektértékelési eredményében közölt feltételek hiánypótlására 2013. december 07-én felszólítottam a kérelmezőt, aki pótolta a mentességi engedélyt, valamint a 2013. december 16-i levelében ismertette az említett elektrofiziológiai kísérleti eljárást és

újrafogalmazta a nem szakmai jellegű összefoglalót. Az elektrofiziológiai kísérletek nem in vivo eljárásokat tartalmaznak, ezért nem szükséges az engedélymódosítás, tehát az ÁTET projektértékelési eredményében közölt feltételek hiánypótlása teljesült.

Határozatomat az állatkísérletekről szóló 40/2013. (II. 14.) Korm. rendelet, V. fejezetében foglaltak, az állatok védelméről és kíméletéről szóló 1998. évi XXVIII. törvény 32. paragrafusa, „a fővárosi és megyei kormányhivatalokról” szóló 288/2010. (XII. 21.) Kormány rendelet 2. § (1) bekezdés 7. pontja, továbbá „a fővárosi és megyei kormányhivatalok mezőgazdasági szakigazgatási szerveinek kijelöléséről” szóló 328/2010. (XII. 27.) Kormány rendelet (továbbiakban Korm. rendelet) 2. § (1) és 6. § (5) bekezdései alapján biztosított jogkörben eljárva, a közigazgatási hatósági eljárás és szolgáltatás általános szabályairól szóló 2004. évi CXL. törvény (továbbiakban: Ket.) 71. § (1) bekezdésének és 72. § (1) bekezdésének megfelelően adom ki.

A jogorvoslati lehetőséget a Ket. 98. § (3) bekezdés c) pontja alapján biztosítottam, a fővárosi és megyei kormányhivatalok mezőgazdasági szakigazgatási szerveinek kijelöléséről szóló 328/2010. (XII. 27.) Kormány rendelete 4. § (1) bekezdése szerint.

A döntés elleni jogorvoslati eljárás díjára vonatkozó rendelkezéseket a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal, valamint a megyei kormányhivatalok mezőgazdasági szakigazgatási szervei előtt kezdeményezett eljárásokban fizetendő igazgatási szolgáltatási díjak mértékéről, valamint az igazgatási szolgáltatási díj fizetésének szabályairól szóló 63/2012. (VII. 2.) VM rendelet 4. § (1) és (3) bekezdései tartalmazzák.

Veszprém, 2013. 12. 20.

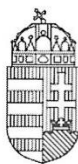



Dr. Leitold József
igazgató főállatorvos

A határozatot kapják:

1. Pirger Zsolt (8237 Tihany, Klebelsberg K. u. 3)
2. MTA Ökológiai Kutatóközpont Balatoni Limnológiai Intézet (ÖK BLI), 8237 Tihany, Klebelsberg K. u. 3.,
3. Veszprém Megyei Kormányhivatal Veszprémi Járási Állategészségügyi és Élelmiszer-ellenőrző Hivatala
4. Irattár

Gyűjtési engedély: VE-I-001/01890-9/2013



VESZPRÉM MEGYEI
KORMÁNYHIVATAL

ÉLELMISZERLÁNC-BIZTONSÁGI ÉS ÁLLATEGÉSZSÉGÜGYI IGAZGATÓSÁGA

Ügyiratszám: VE-I-001/01890-*8/2013* Tárgy: mentesség biztosítása a vadon befogott, természetvédelmi oltalom alá nem tartozó állat vonatkozásában

Ügyintéző: Dr. Holló Zsuzsa Hiv. szám: -

Telefon: 88/579-277 Melléklet: -

HATÁROZAT

Dr. Pirger Zsolt (MTA Ökológiai Kutatóközpont **Balatoni Limnológiai Intézet**, 8237 Tihany, Klebelsberg K. u. 3), az MTA Ökológiai Kutatóközpont **Balatoni Limnológiai Intézet**, 8237 Tihany, Klebelsberg K. u. 3. szám alatti telephelyén az általa előterjesztett „Peptid-fehérje összetétel dinamikus változása a környezeti kihívásokhoz való adaptáció során vízi modellállatokban/Dynamic changes of peptide-protein composition in aquatic animals underlying adaptation to environmental challenges” - 109099 számú PD-OTKA pályázat című **projekt keretében történő** vadon befogott, természetvédelmi oltalom alá nem tartozó

- 300 db bodorka (*Rutilus rutilus*) és

- 300 db csapósügér (*Perca fluviatilis*)

felhasználására **állatvédelmi hatósági jogkörben** eljárva **mentességi kérelmének helyt adok.**

Ezen engedély az elektromos halászgép használatára és halfogásra nem jogosítja fel a kérelmezőt!

Felhívom figyelmét, hogy a jelen határozat nem helyettesíti a más jogszabályok szerinti hatósági engedélyeket, a tevékenység végzése, csak a szükséges egyéb állatvédelmi és halászati **engedélyek birtokában kezdhető meg.**

Jelen határozat ellen, annak közlésétől számított 15 napon belül a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal Elnökének címzett (1024 Budapest, Keleti Károly u. 24.), de hatóságomhoz (Veszprém Megyei Kormányhivatal Élelmiszerlánc-biztonsági és Állategészségügyi Igazgatósága, 8200 Veszprém, Dózsa György út 33.) 2 példányban benyújtott **fellebbezésnek van helye.**

A döntés elleni **jogorvoslati eljárás díja** 10.000 forint. **A jogorvoslati díj befizetését igazoló bizonylatot a fellebbezési kérelemhez csatolni kell.**

A jogorvoslati eljárás díját a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal Magyar Államkincstárnál vezetett, 10032000-00289782-00000000 számlájára, **átutalás vagy a számlára történő készpénzbefizetés útján kell megfizetni.** A fizetési megbízás közlemény rovatában fel kell tüntetni a fellebbezéssel támadott döntés számát, a „jogorvoslati eljárási díj” megnevezést és az ügyfél adószámát, illetve adóazonosító jelét.

A fellebbezés elektronikus úton történő benyújtására nincs lehetőség.

INDOKOLÁS

A **dr. Pirger Zsolt** (MTA Ökológiai Kutatóközpont Balatoni Limnológiai Intézet, 8237 Tihany, Klebelsberg K. u. 3) által benyújtott, az MTA Ökológiai Kutatóközpont Balatoni Limnológiai Intézet, 8237 Tihany, Klebelsberg K. u. 3. szám alatt nyilvántartott intézményében végzendő „projekt engedély iránti kérelmét” az állatkísérletekről szóló 40/2013. (II. 14.) Korm. rendeletnek megfelelően felterjesztettem az Állatkísérleti Tudományos Etikai Tanács számára projektértékelésre.

Az eljárás során megállapítottam, hogy az MTA Ökológiai Kutatóközpont **Balatoni Limnológiai Intézet**, az állatok védelméről és kíméletéről szóló 1998. évi XXVIII. törvény 26 §-nak megfelelő nyilvántartásba vett intézmény.

Az intézményben az állatvédelmi jogszabályok teljesülésének biztosításáért felelős személy **Dr. Takács Péter** okleveles biológus, a MÁB elnök **Dr. Erős Tibor** okleveles biológus, állatok jólétéért és gondozásának felügyeletéért felelős személy, **Dr. Pirger Zsolt** okleveles biológus és **Poller Zoltán** intézeti mérnök, valamint az intézményt ellátó állatorvos szakértő **Dr. Zoltán Levente**.

Az Állatkísérleti Tudományos Etikai Tanács VE-I-001/01890-5/2013 (KA-1488) számú, az alábbiakban közölt projektértékelése a mentesség megadását indokoltnak ítélte.

„A projektértékelés eredménye: engedélyezhető az alábbi feltételekkel

1. A kérelemben említett, de nem ismertetett elektrofiziológiai kísérletek elvégzéséhez engedélymódosítási kérelem lesz szükséges.

2. A kérelmezőnek mentességi kérelmet kell pótlólag az Igazgatóságnak benyújtania vadon élő állat kísérletben való felhasználására tudományos indokok alapján. A mentesség megadása indokolt.

3. A nem szakmai jellegű összefoglaló újraírását javasoljuk az engedélyezendő projektre vonatkozó konkrétumok befoglalásával és a jogszabályban előírt tartalmi elemekre kitérve.

A projektengedély az alább felsorolt kísérletekre és a megadott súlyossági besorolással érvényes:

Kísérlet megnevezése	súlyossági besorolás
1. maximum 14 hónapos hormonkezelés (fürdővízbe keverve)	mérsékelt
2. mesterséges hibernálás a fürdővíz lehűtésével	mérsékelt
3. befogás elektromos halászgéppel	mérsékelt

A projektengedély az alább felsorolt állatokra és tervezett állatszámra érvényes:

- bodorka (*Rutilus rutilus*) 300 db
- csapósügér (*Perca fluviatilis*) 300 db

Támogatott mentességi kérelmek: vadon élő állat befogására

Visszamenőleges értékelés szükségessége: nem szükséges

Ártalom-haszon elemzés: A tisztított szennyvízből az élővizekbe, így a Balatonba is bekerülő hormonszennyezés a táplálékláncon keresztül hatással lehet a vízben élő szerveze-

tekre, és drasztikus változásokat okoz az arra érzékeny halak endokrin szabályozásában. A projekt a hormonterheléshez való alkalmazkodás (hibernáció és inaktív állapot) hátterében álló pestid-protein profilok vizsgálatát tűzi ki célul rutinszerű biokémiai, molekuláris biológiai és szövettani vizsgálati módszerek alkalmazásával. A tudományos haszon arányos a mérsékelt ártalommal.

A projekt - az engedély feltételeinek betartása mellett - megfelel a 40/2013. (II.14) Korm. rendelet 42. § (1) bekezdés a) -c) pontjaiban foglalt feltételeknek."

Az ÁTET projektértékelési eredményében közölt feltételek hiánypótlására 2013. 12. 07-én felszólítottam a kérelmezőt, aki 2013. december 16-i levelében tudományos indokok alapján kérelmet nyújtott be a **természetvédelmi oltalom alatt nem álló vadon befogott állat kísérletben való felhasználására.**

A kérelemhez mellékelte az elektromos halászgép nyilvántartási lapját, a 2013-as évre szóló érvényes országos halászbizonyítványt, a Balatoni Halgazdálkodási Nonprofit Zrt. nyilatkozatát, valamint a NÉBIH területi engedélyét.

Megvizsgáltam a benyújtott dokumentációt, megállapítottam, hogy az értékelt projektre vonatkozóan a NÉBIH területi engedélye halászatra nem jogosít, ezért a halászati engedélyeket az adott halászati évre a halgazdálkodásról és a hal védelméről szóló 2013. évi CII. törvény szerint pótolni kell.

Jelen határozatom a külön jogszabályokban előírt engedélyek birtokában, azokkal együtt jogosít fel a tevékenység végzésére

Határozatomat **az állatkísérletekről szóló 40/2013. (II. 14.) Korm. rendelete 7. § (1) bekezdése**, az állatok védelméről és kíméletéről szóló 1998. évi XXVIII. törvény 30. § (6) bekezdése „a fővárosi és megyei kormányhivatalokról” szóló 288/2010. (XII. 21.) Kormány rendelet 2. § (1) bekezdés 7. pontja, továbbá „a fővárosi és megyei kormányhivatalok mezőgazdasági szakigazgatási szerveinek kijelöléséről” szóló 328/2010. (XII. 27.) Kormány rendelet (továbbiakban Korm. rendelet) 2. § (1) és 6. § (5) bekezdései alapján biztosított jogkörben eljárva, a közigazgatási hatósági eljárás és szolgáltatás általános szabályairól szóló 2004. évi CXL. törvény (továbbiakban: Ket.) 71. § (1) bekezdésének és 72. § (1) bekezdésének megfelelően adom ki.

A jogorvoslati lehetőséget a Ket. 98. § (3) bekezdés c) pontja alapján biztosítottam, a fővárosi és megyei kormányhivatalok mezőgazdasági szakigazgatási szerveinek kijelöléséről szóló 328/2010. (XII. 27.) Kormány rendelete 4. § (1) bekezdése szerint.

A döntés elleni jogorvoslati eljárás díjára vonatkozó rendelkezéseket a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal, valamint a megyei kormányhivatalok mezőgazdasági szakigazgatási szervei előtt kezdeményezett eljárásokban fizetendő igazgatási szolgáltatási díjak mértékéről, valamint az igazgatási szolgáltatási díj fizetésének szabályairól szóló 63/2012. (VII. 2.) VM rendelet 4. § (1) és (3) bekezdései tartalmazzák.

Veszprém, 2013. 12. 19.




Dr. Leitold József
igazgató főállatorvos

A határozatot kapják:

- ① Pirger Zsolt (8237 Tihany, Klebelsberg K. u. 3)
2. MTA Ökológiai Kutatóközpont Balatoni Limnológiai Intézet (ÖK BLI), 8237 Tihany, Klebelsberg K. u. 3.,
3. Veszprém Megyei Kormányhivatal Veszprémi Járási Állategészségügyi és Élelmiszer-ellenőrző Hivatala
4. Irattár

Tartási engedély: VE-I-001/01890-3/2013



VESZPRÉM MEGYEI
KORMÁNYHIVATAL

ÉLELMISZERLÁNC-BIZTONSÁGI ÉS ÁLLATEGÉSZSÉGÜGYI IGAZGATÓSÁGA

Ügyiratszám: VE-I-001/01890-3/2013

Tárgy: Kísérleti állat beszállító, tenyésztő és felhasználó hely engedélyezése

Ügyintéző: Dr. Holló Zsuzsanna
Telefon: 88/579-277

HATÁROZAT

Az MTA Ökológiai Kutatóközpont **Balatoni Limnológiai Intézet** (ÖK BLI), 8237 Tihany, Klebelsberg K. u. 3., mint üzembentartó kérelmére a 8237 Tihany, Klebelsberg K. u. 3. telephelyén (A és C épületek állatszobáiban) történő kísérleti állatok tartását (hal és béka)

2023. augusztus 21-ig engedélyezem.

E határozat ellen a kézbesítést követő naptól számított 15 napon belül a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal (1024 Budapest, Keleti K. u. 24.) Elnökéhez címzett, de a Veszprém Megyei Kormányhivatal Élelmiszerlánc-biztonsági és Állategészségügyi Igazgatóságához benyújtott 5000 Ft, azaz ötezer forint illetékbélyeggel ellátott fellebbezéssel élhet.

A fellebbezés elektronikus úton történő benyújtására nincs lehetőség.

INDOKOLÁS

Az eljárás során a benyújtott dokumentációból, valamint a helyszíni szemle eredményei alapján (jk. 0047205) megállapítottam, hogy az állattartó hely megfelel az állatok védelméről szóló 1998. évi XXVIII. törvény, valamint az állatkísérletekről rendelkező 40/2013 (II. 14.) Kormány rendelet részletes szabályainak.

Az intézményben az állatvédelmi jogszabályok teljesülésének biztosításáért felelős személy Dr. Takács Péter okleveles biológus, a MÁB elnök Dr. Erős Tibor okleveles biológus, állatok jólétéért és gondozásának felügyeletéért felelős személy, Dr. Pirger Zsolt okleveles biológus és Poller Zoltán intézeti mérnök, valamint az intézményt ellátó állatorvos szakértő Dr. Zoltán Levente.

Felhívom figyelmét, hogy az állatkísérletekről rendelkező 40/2013 (II. 14.) Kormány rendelet 16. §. (3) bekezdése szerint az engedély módosítását kell kérni az élelmiszer-

lánc-biztonsági és állategészségügyi igazgatóságtól a tenyésztő, beszállító vagy felhasználó valamely létesítményének szerkezetében vagy funkciójában bekövetkezett minden olyan jelentős változás esetén, amely az állatok jólétét hátrányosan érintheti, valamint a (4) bekezdése szerint az élelmiszerlánc-biztonsági és állategészségügyi igazgatóságot értesíteni kell a (2) bekezdésben említett személyekben beállt változásról, a változást követően 30 napon belül.

Jelen határozatom a külön jogszabályokban előírt engedélyek birtokában, azokkal együtt jogosít fel a tevékenység végzésére.

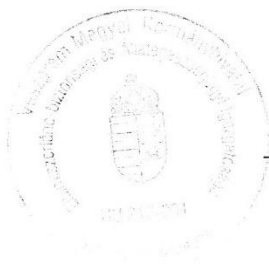
Határozatomat a közigazgatási hatósági eljárás és szolgáltatás általános szabályairól szóló 2004. évi CXL. törvény 71. § (1) bekezdése alapján eljárva, az állatkísérletekről rendelkező 40/2013 (II. 14.) Kormány rendelet 16 §. (1) pontjában biztosított jogkörömnél fogva hoztam meg.

A jogorvoslat lehetőségét a Ket. 98. § (1) bekezdése alapján biztosítottam, a Korm. rendelet 7. § (1) bekezdése szerint.

A fellebbezési eljárás illetékéről szóló tájékoztatás „az illetékekről” szóló 1990. évi XCIII. törvény 29. § (2) bekezdésnek megfelelően történt.

A fővárosi és megyei kormányhivatalokról, valamint a fővárosi és megyei kormányhivatalok kialakításával és a területi integrációval összefüggő törvénymódosításokról szóló 2010. évi CXXVI. törvény 5. §-a, illetve a fővárosi és megyei kormányhivatalokról szóló 288/2010. (XII. 21.) Korm. rendelet 29. § (1) bekezdése értelmében a Veszprém Megyei Mezőgazdasági Szakigazgatási Hivatal jogutódja a székhelye szerinti Megyei Kormányhivatal.

Veszprém, 2013. augusztus 22.



Dr. Leitold József
igazgató főállatorvos

A határozatot kapják:

1. MTA Ökológiai Kutatóközpont Balatoni Limnológiai Intézet (ÖK BLI), 8237 Tihany, Klebelsberg K. u. 3.,
2. Veszprém Megyei Kormányhivatal Veszprémi Járási Állategészségügyi és Élelmiszer-ellenőrző Hivatala
3. Irattár

10 Ábrák és táblázatok jegyzéke

10.1 Ábrák jegyzéke

1. ábra A progesztogének és a DJ-1 fehérje közös célmolekulái és lehetséges kapcsolódási pontjai.	17
2. ábra A nagy mocsári csiga (<i>Lymnaea stagnalis</i>).	18
3. ábra Szteroid hormonok szintézise puhatestűekben.....	20
4. ábra A reprodukció szabályozása, funkcionális lateralizáció <i>L. stagnalis</i> -ban.....	21
5. ábra Bodorka (<i>Rutilus rutilus</i>)	23
6. ábra A kísérleti elrendezés, a vízcserék és a mintagyűjtések időzítése.	28
7. ábra A <i>L. stagnalis</i> ~100 db, ≥ 96 órás tojást tartalmazó petezsákja.....	29
8. ábra A VTG-szerű fehérje mennyiségi változása progesztogén kezelés hatására felnőtt állatokban.....	39
9. ábra Az agy és a középbel mirigy DJ-1 mennyisége a 21 napos kezelési periódus 7. és 21. napjain <i>L. stagnalis</i> -ban, ELISA technikával meghatározva.....	40
10. ábra <i>L. stagnalis</i> CNS-ének fénymikroszkópos képe és a GnRH immunpozitív sejtek lokalizációjának sematikus megjelenítése a CNS-ben.....	41
11. ábra A VG, RPG és RCG GnRH immunjelölődése kontroll és progesztogén kezelt csigákban.....	43
12. ábra L/RPeG a kontroll (A és C) és 10 ng/L progesztogén kezelt (B és D) állatokban.	44
13. ábra Spermium szám meghatározása <i>L. stagnalis</i> -ban áramlási citrometiával...	45
14. ábra A petesejt termelés és a petezsákok minőségének változása a felnőtt állatok progesztogén kezelésének hatására.	47
15. ábra Az egy-sejtes zigóta metabolomikai elemzésének folyamata.	52
16. ábra Szikanyag mikromintavétel metabolomikai elemzéshez csigatojásból.	54
17. ábra A szikanyagban található egyes metabolitok arányának elemzése.....	55
18. ábra A kontroll és kezelt csoportok szomatikus indexei.....	57
19. ábra A különböző koncentrációjú progesztogén kezelés hatása a VTG szintekre bodorkában.....	58
20. ábra DJ-1 fehérje koncentráció meghatározása „szendvics” ELISA módszerrel bodorka agyban és májban.	59
21. ábra DJ-1 immunpozitív elemek eloszlása a bodorka májszövetében 500 ng/L progesztogén kezelés előtt (A) és után (B)..	60
22. ábra Progesztogén kezelés hatása a szérum lipid szintekre bodorkában.	61
23. ábra A szignalizációs molekulák és útvonalak sematikus ábrázolása, amelyek a sejt-ciklus és a metabolizmus szabályozásában vesznek részt, valamint a hexóz felhasználás sematikus megjelenítése a citoplazmában.	70
24. ábra A progesztogének hatása a szérum LDL-koleszterin szintre.	74

10.2 Táblázatok jegyzéke

1. **táblázat** A kísérleteinkben alkalmazott progesztogének valamint az általuk kifejtett receptor aktivitás relatív kötődési affinitásban kifejezve (RBA - a progeszteronhoz viszonyítva)..... 10
2. **táblázat** A humán GnRH1 analóg és egyéb, puhatestűekben található GnRH-szerű fehérje analógok szekvenciái 22
3. **táblázat** Három részes petezsák értékelési rendszer..... 30
4. **táblázat** A sejtproliferáció időablaka az embriógenézis korai szakaszában 48
5. **táblázat** Az egysejtes zigótában (peterakást követő egy órán belül) és a szikanyagban (peterakást követő 1. és 96. órában) azonosított molekulák. 50
6. **táblázat** Progesztogén kezelés hatása a stressz fehérjékre bodorkában 62

11 Az értekezés alapjául szolgáló tudományos közlemények és előadások

11.1 Közlemények

11.1.1 Az értekezés alapjául szolgáló tudományos közlemények idegen nyelven

Zrinyi Z, Maasz G, Zhang L, Vertes A, Lovas S, Kiss T, Elekes K, Pirger Z (2017) Effect of progesterone and its synthetic analogs on reproduction and embryonic development of a freshwater invertebrate model. *Aquat Toxicol* 190:94-103. (IF₂₀₁₂₋₂₀₁₆: 4,425)

Maasz G*, **Zrinyi Z***, Takacs P, Lovas S, Fodor I, Kiss T, Pirger Z (2017) Complex molecular changes induced by chronic progestogens exposure in roach, *Rutilus rutilus*. *Ecotox Environ Safe* 139:9-17. (IF₂₀₁₂₋₂₀₁₆: 3,246)

Pirger Z, **Zrinyi Z**, Maász G, Molnár É, Kiss T (2017) Pond snail reproduction as model in the environmental risk assessment – reality and doubts. In: Sajal Ray (Eds.) *Biological Resources of Water*. Rijeka: InTech. (ISBN: 978-953-51-5833-2) (In press.)

Avar P, Maasz G, Takács P, Lovas S, **Zrinyi Z**, Svigruha R, Takátsy A, Tóth LG, Pirger Z (2016) HPLC-MS/MS analysis of steroid hormones in environmental water samples. *Drug Test Anal* 8:123-27. (IF₂₀₁₆: 3,469)

Avar P, **Zrinyi Z**, Maász G, Takátsy A, Lovas S, G.-Tóth L, Pirger Z (2016) β -estradiol and ethinyl-estradiol contamination in the rivers of the Carpathian Basin. *Environ Sci Pollut R* 23:11630-38. (IF₂₀₁₆: 2,741)

11.1.2 Az értekezés alapjául szolgáló tudományos közlemények magyar nyelven

Zrinyi Z, Zhang L, Maász G, Vértés Á, Elekes K, Pirger Z (2016) Elsődleges vízi szennyezők hatása a nagy mocsári csiga szaporodására és embrionális fejlődésére. *Hidrológiai Közlöny* 96:103-07.

Pirger Z, Maász G, Takács P, Lovas S, **Zrínyi Z**, Svigruha R, Takátsy A, G -Tóth L, Avar P (2015) Humán eredetű szteroid szennyezések kimutatása a Balaton és a Zala vízgyűjtőjén HPLC MS/MS analitikai módszerrel. *Hidrológiai Közlöny* 95:68-72.

11.2 Előadások

11.2.1 Az értekezés alapjául szolgáló tudományos előadások idegen nyelven

Vertes A, **Zrínyi Z**, Maasz G, Zhang L, Compton LR, Laszlo Z, Pirger Z (2015) High performance methods for metabolomic and lipidomic analysis of the *Lymnaea stagnalis* embryonic development and central nervous system. In: 13th Symposium on Invertebrate Neurobiology: program and abstracts. Konferencia helye, ideje: Tihany, Magyarország, 2015.08.26-2015.08.30.

Poszterek

Zrínyi Z, Lovas S, Maász G, Kiss T, Elekes K, Pirger Z (2015) Effect of endocrine disruptors on embryonic development of *Lymnaea stagnalis*. In: 13th Symposium on Invertebrate Neurobiology: program and abstracts. Konferencia helye, ideje: Tihany, Magyarország, 2015.08.26-2015.08.30.

Zrínyi Z, Zhang L, Vértés Á, Elekes K, Schmidt J, Pirger Z, Maász G (2016) Capillary-microsampling combined ms techniques: an easy way to giving answer to biological questions. In: 34th Informal Meeting on Mass Spectrometry. Konferencia helye, ideje: Fiera di Primiero, Olaszország, 2016.05.15-2016.05.18.

Avar P, Maasz G, **Zrínyi Z**, Takátsy A, Pirger Z (2015) Quantitative measurement of 17 β -estradiol and Ethinyl estradiol in some Central-European rivers. In: EMEC 16: 16th European Meeting on Environmental Chemistry. Konferencia helye, ideje: Torino, Olaszország, 2015.11.30-2015.12.03.

11.2.2 Az értekezés alapjául szolgáló tudományos előadások magyar nyelven

Zrínyi Z, Linwen Z, Maász G, Vértés Á, Elekes K, Pirger Z (2015) Elsődleges vízi szennyezők hatása a nagy mocsári csiga, *Lymnaea stagnalis* szaporodására és embrionális fejlődésére. In: LVII. Hidrobiológus Napok: Genetikai és molekuláris biológiai kutatások jelentősége a hidrobiológiában. Konferencia helye, ideje: Tihany, Magyarország, 2015.10.07-2015.10.09.

Zrínyi Z, Linwen Z, Vértés Á, Pirger Z, Maász G (2015) Szteroid szennyezők hatásának vizsgálata mikromennyiségű minták esetében In: XII. Környezetvédelmi analitikai és technológia konferencia: a jelen és a jövő analitikai eljárásai és technológiái az egészséges emberi környezetért. Konferencia helye, ideje: Balatonszárszó, Magyarország, 2015.10.07-2015.10.09. Balatonszárszó: Magyar Kémikusok Egyesülete (MKE).

Avar P, Maász G, Takács P, Lovas S, **Zrínyi Z**, Svigruha R, Takátsy A, G -Tóth L, Pirger Z (2015) Szteroid szennyezők tömegspektrometriás vizsgálata a Balaton vízgyűjtő területén. In: XII. Környezetvédelmi analitikai és technológia konferencia: a jelen és a jövő analitikai eljárásai és technológiái az egészséges emberi környezetért.

Konferencia helye, ideje: Balatonszárszó, Magyarország, 2015.10.07-2015.10.09.
Balatonszárszó: Magyar Kémikusok Egyesülete (MKE).

Posztterek

Maász G, **Zrínyi Z**, Takács P, Lovas S, Fodor I (2016) Krónikus progesztogén terhelés indukálta molekuláris, szövettani és szomatikus index változások az őshonos búzaszemű keszegen (*Rutilus rutilus*). In: FAMÉ 2016: Magyar Farmakológiai, Anatómus, Mikrocirkulációs és Élettani Társaságok Közös Tudományos Konferenciája. Konferencia helye, ideje: Pécs, Magyarország, 2016.06.01-2016.06.04.

Zrínyi Z, Zhang L, Maász G, Vértes Á, Pirger Z (2016) Progesztogének hatása a nagy mocsári csiga szaporodására és embrionális fejlődésére. In: FAMÉ 2016: Magyar Farmakológiai, Anatómus, Mikrocirkulációs és Élettani Társaságok Közös Tudományos Konferenciája. Konferencia helye, ideje: Pécs, Magyarország, 2016.06.01-2016.06.04.

12 Az értekezés témáján kívüli közlemények, előadások és absztraktok

12.1 Közlemények

12.1.1 Az értekezés témáján kívüli közlemények idegen nyelven

Montsko G, **Zrínyi Z**, Varnagy A, Bodis J, Kovacs GL (2017) Non-invasive Assessment of the Embryo Viability via the Analysis of the Culture Medium. In: Wu Bin (Eds.) *Embryo Cleavage*. Rijeka: InTech. (ISBN:978-953-51-5327-6)

Maasz G, **Zrínyi Z**, Reglodi D, Petrovics D, Rivnyak A, Kiss T, Jungling A, Tamas A, Pirger Z (2017) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) has neuroprotective function in dopamine-based neurodegeneration developed in two parkinsonian models. *Dis Model Mech* 10:127-39.

Kovács GL, Montskó G, **Zrínyi Z**, Farkas N, Várnagy Á, Bódis J (2016) Non-invasive assessment of viability in human embryos fertilized *in vitro*. *E-JIFCC* 27:112-21.

Poór M, **Zrínyi Z**, Kőszegi T (2016) Structure related effects of flavonoid aglycones on cell cycle progression of HepG2 cells: Metabolic activation of fisetin and quercetin by catechol-O-methyltransferase (COMT). *Biomed Pharmacother* 83:998-1005.

Szélig L, Kun Sz, Woth G, Molnár G, **Zrínyi Z**, Kátai E, Lantos J, Wittmann I, Bogár L, Miseta A, Csontos Cs (2016) Time courses of changes of para-, meta-, and ortho-tyrosine in septic patients: A pilot study. *Redox Rep* 21:180-89.

Montskó G, **Zrínyi Z**, Janáky T, Szabó Z, Várnagy Á, Kovács GL, Bódis J (2015) Noninvasive embryo viability assessment by quantitation of human haptoglobin alpha-1 fragment in the *in vitro* fertilization culture medium: an additional tool to increase success rate. *Fertil Steril* 103:687-93.

Poór M, Veres B, Jakus P, Antus Cs, Montskó G, **Zrínyi Z**, Vladimir-Knežević S, Petrik J, Kőszegi T (2014) Flavonoid diosmetin increases ATP levels in kidney cells and relieves ATP depleting effect of ochratoxin A. *J Photoch Photobio B* 132:1-9.

Nagy T, Frank D, Katai E, Yahiro RK, Poor VS, Montsko G, **Zrínyi Z**, Kovacs GL, Miseta A (2013) Lithium Induces ER Stress and N-Glycan Modification in Galactose-Grown Jurkat Cells. *Plos One* 8: e70410.

12.1.2 Az értekezés témáján kívüli közlemények magyar nyelven

Zrínyi Z, Várnagy Á, Gödöny K, Montskó G, Kovács LG, Bódis J (2014) Az embrió életképességének képi és biokémiai indikátorai *in vitro* fertilizáció során. *Egészség-Akadémia* 5:12-16.

Montskó G, **Zrínyi Z**, Janáky T, Szabó Z, Várnagy Á, Kovács GL, Bódis J (2014) Embrió életképesség vizsgálata a tápoldatban található peptid biomarkerek segítségével. *Egészség-Akadémia* 5:215-22.

Szélig L, Woth G, Kun S, **Zrínyi Z**, Molnár G, Lantos J, Wittmann I, Bogár L, Miseta A, Csontos Cs (2014) Az oxidatív stressz hatása a meta-, ortho-, és para-tyrosin szintézisre szeptikus betegekben. Előtanulmány. *Érbetegségek* 21:44-45.

Kovács P, Wittmann I, Kun Sz, Szélig L, Molnár G, Bogár L, Miseta A, **Zrínyi Z**, Csontos Cs (2014) Vizelet és szérum para-, meta-, és orto-tirozin szintjének vizsgálata égett és szeptikus betegekben. *Aneszteziológia és Intenzív Terápia* 44:13.

12.2 Előadások

12.2.1 Az értekezés témáján kívüli előadások idegen nyelven

Zrínyi Z (2015) Directions of embryo quality assessment during *in vitro* fertilization: the real value of morphology. In: Charles University in Prague Faculty of Medicine in Hradec Králové, 12th International Medical Postgraduate Conference: New Frontiers in the Research of PhD Students: Conference of Medical Schools. Konferencia helye, ideje: Hradec Kralove, Csehország, 2015.11.26-2015.11.27. Hradec Kralove: Charles University, pp. 120-125.

Maász G, **Zrínyi Z**, Petrovics D, Rivnyák Á, Tamás A, Márk L, Kiss T, Reglődi D, Pirger Z (2015) Evolutionarily conserved neuroprotective function of pituitary adenylate cyclaseactivating polypeptide (PACAP) in dopamine-based neurodegeneration. In: 13th Symposium on Invertebrate Neurobiology: program and abstracts. Konferencia helye, ideje: Tihany, Magyarország, 2015.08.26-2015.08.30.

Maasz G, **Zrínyi Z**, Petrovics D, Rivnyak A, Tamas A, Mark L, Kiss T, Reglodi D, Pirger Z (2015) Evolution conserved neuroprotective function of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in dopamine-based neurodegeneration: Poster presentation. In: 15TH BIENNIAL CONFERENCE OF THE HUNGARIAN NEUROSCIENCE SOCIETY. Konferencia helye, ideje: Budapest, Magyarország, 2015.01.22-2015.01.23. Budapest: Hungarian Academy of Sciences.

Kovacs P, Bogar L, Wittmann I, Miseta A, Szélig L, Kun Sz, **Zrínyi Z**, Molnar G, Csontos Cs (2014) Changes of para- meta- and ortho-tyrosine levels in serum and urine of septic and burned patients. In: YES Meeting: 9th Young European Scientist Meeting. Konferencia helye, ideje: Porto, Portugália, 2014.09.18-2014.09.21. Porto: Faculdade de Medicina da Universidade do Porto.

Szélig L, Kun Sz, **Zrínyi Z**, Molnár G, Lantos J, Woth G, Wittmann I, Miseta A, Bogár L, Csontos Cs (2014) Az oxidatív stressz hatása a meta-, ortho-, és para-tyrosin szintézisre szeptikus betegekben. Előtanulmány. Magyar Aneszteziológiai és Intenzív Terápiás Társaság 42. Kongresszusa. Siófok, Magyarország: 2014.05.22 -2014.05.24.

Poszterek

Zrínyi Z, Petrovics D, Rivnyak A, Tamas A, Mark L, Kiss T, Reglodi D, Maasz G, Pirger Z (2015) Evolutionarily conserved neuroprotective function of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in dopamine-based neurodegeneration. 33rd Informal Meeting on Mass Spectrometry, Szczyrk, Lengyelország, 2015.05.10-2015.05.13.

12.2.2 Az értekezés témáján kívüli előadások magyar nyelven

Zrínyi Z (2013) A magzat vitalitásának képi és biokémiai indikátorai *in vitro* fertilizáció során. In: PTE ETK Egészségtudományi Doktori Iskola III. Tudományos Fóruma. Konferencia helye, ideje: Pécs, Magyarország, 2013.12.02.

Zrínyi Z, Montskó G, Kovács LG, Bódis J (2014) Az embrió viabilitásának képi indikátorai *in vitro* fertilizáció során. In: 44. Membrán-transzport konferencia. Konferencia helye, ideje: Sümeg, Magyarország, 2014.05.20-2014.05.23.

Poszterek

Jüngling A, Reglodi D, Maász G, **Zrínyi Z**, Császár A, Rivnyák Á, Petrovics D, Fülöp BD, Gaszner B, Kiss I, Pirger Z, Tamás A (2016) A korai ingergazdag környezet és a PACAP kezelés hatásának vizsgálata a dopamin szint változására 1 éves patkány Parkinson-kór modellben. In: FAMÉ 2016: Magyar Farmakológiai, Anatómus, Mikrocirkulációs és Élettani Társaságok Közös Tudományos Konferenciája. Konferencia helye, ideje: Pécs, Magyarország, 2016.06.01-2016.06.04.

12.3 Összefoglaló tudományometriai táblázat az MTMT adatbázis alapján

MTMT közlemény és idéző összefoglaló táblázat

Zrínyi Zita adatai (2017.09.05.)

Közlemény típusok	Szám		Hivatkozások ¹	
	Összesen	Részletezve	Független	Összes
Teljes tudományos közlemények ²				
I. Tudományos folyóiratcikk	15	---	---	---
nemzetközi szakfolyóiratban	---	11	37	45
hazai kiadású szakfolyóiratban idegen nyelven	---	0	0	0
hazai kiadású szakfolyóiratban magyar nyelven	---	4	0	0
II. Könyvek	0	---	---	---
a) Könyv, szerzőként	0	---	---	---
idegen nyelvű	---	0	0	0
magyar nyelvű	---	0	0	0
b) Könyv, szerkesztőként	0	---	---	---
idegen nyelvű	---	0	³ ---	---
magyar nyelvű	---	0	---	---
III. Könyvrészlet	1	---	---	---
idegen nyelvű	---	1	0	0
magyar nyelvű	---	0	0	0
IV. Konferenciaközlemény folyóiratban vagy konferenciakötetben	1	---	---	---
Idegen nyelvű	---	1	0	0
Magyar nyelvű	---	0	0	0
Tudományos közlemények összesen (I.-IV.)	17	---	37	45
További tudományos művek⁴	---	1	0	0

Idézetek száma⁵	---	---	38	46
-----------------------------------	-----	-----	----	----

Oktatási művek				
Felsőoktatási tankönyv	0	---	---	---
Idegen nyelvű	---	0	0	0
Magyar nyelvű	---	0	0	0
Felsőoktatási tankönyv része idegen nyelven	---	0	0	0
Felsőoktatási tankönyv része magyar nyelven	---	0	0	0
További oktatási művek	0	---	0	0

Olthalmi formák	0	---	0	0
------------------------	---	-----	---	---

Alkotás	0	---	0	0
----------------	---	-----	---	---

Ismeretterjesztő művek				
Könyvek	0	---	0	0

További művek	0	---	0	0
---------------	---	-----	---	---

Közérdekű és nem besorolt művek	0	---	0	0
---------------------------------	---	-----	---	---

Absztrakt	21	---	1	1
-----------	----	-----	---	---

Egyéb szerzőség	0	---	0	0
Idézők szerkesztett művekben	---	---	0	0
Idézők disszertációban, egyéb típusban	0	---	1	1
Idézők összesen, minden típus, minden jelleg	---	---	39	47

Megjegyzések:

A táblázat számai hivatkozások is. A számra kattintva a program listázza azokat a műveket, amelyeket a cellában összeszámlált.

--- : Nem kitölthető cella

¹ A hivatkozások a disszertáció és egyéb típusú idézők nélkül számolva. A disszertáció és egyéb típusú idézők összesítve a táblázat végén található.

² Teljes tudományos közlemény ebben az adatbázisban:

- Folyóiratcikk : szakcikk/tanulmány, összefoglaló cikk, rövid közlemény, sokszerzős vagy csoportos szerzőségű közlemény, forráskiadás, recenzió/kritika, műkritika, esszé

- Könyv: szakkönyv, monográfia, kézikönyv, tanulmánykötet, forráskiadás, kritikai kiadás, műhelytanulmány, atlasz

- Könyvrészlet: szaktanulmány, fejezet, esszé, forráskiadás, recenzió/kritika, műkritika, műtárgyleírás, térkép, műhelytanulmány része

- Konferenciaközlemény: folyóiratban, könyvben, egyéb konferenciakötetben megjelent legalább 3 oldal terjedelemben

- Oltalmi formák: szabadalmak, mintaoltalmak (részletek)

³ Szerkesztőként nem részesedik a könyv idézéséből

⁴ Ide értve a teljes közlemények listájában nem szereplő publikációkat, a nem ismert lektoráltságú folyóiratokban megjelent műveket és minden olyan tudományos művet, ami a I.-IV. sorokban nem került összeszámlálásra.

⁵ A disszertációk és egyéb típusú idézők nélkül számolva. A sor értéke a "Tudományos közlemények összesen (I.-IV.)", a "További tudományos művek" és az "Absztrakt" sorok idézettség értékeit összegzi.

13 Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, **Dr. Pirger Zsolt** tudományos főmunkatársnak előremutató tanácsaiért és irányításáért, amellyel segítette eddigi munkámat.

Köszönettel tartozom férjemnek és kollégámnak, **Dr. Maász Gábor** tudományos munkatársnak a támogatásért, biztató szavaiért, az iránymutatásért és mindazért, amivel hozzásegít a szakmai fejlődéshez.

Hálás szívvel mondok köszönetet **Kiss Tibor** és **Elekes Károly** professzor uraknak minden segítségükért és az építő kritikákért, amellyel segítették munkámat és akik soha nem mondtak nemet a segítségkérésre.

Vértés Ákos professzor úrnak, a Vértés Research Group vezetőjének és **Linwen Zhang** doktorjelöltnek, valamint a csoport többi tagjának is, akik a George Washington Egyetemen tett látogatásaim alkalmával befogadtak, szakmai segítséget nyújtottak és segítettek egy működő kooperáció kiépülését.

Köszönetemet fejezem ki az **MTA Ökológiai Kutatóközpont Balatoni Limnológiai Intézet dolgozóinak**, kiemelve a **NAP_B Adaptációs Neuroetológiai Kutatócsoport munkatársait**, valamint **Dr. Pálffy Károly** tudományos munkatársat és **Nagyné Fekete Zsuzsa** asszisztenst.

Hálával tartozom **Kovács L. Gábor** professzor úrnak, a Szentágothai János Kutatóközpont elnökének, egykori főnökömnek, aki elindított és mindvégig támogatott a tudományos pályán.

Köszönöm **családomnak** és **barátaimnak**, hogy mindvégig mellettem álltak, támogattak.

14 Irodalomjegyzék

-
- ¹ **Huezo CM** (1998) Current reversible contraceptive methods: a global perspective. *Int J Gynaecol Obstet.* 62 Suppl 1:S3-15.
- ² **Aris AZ, Shamsuddin AS, Praveena SM** (2014) Occurrence of 17alpha-ethynylestradiol (EE2) in the environment and effect on exposed biota: a review. *Environ Int* 69:104-119.
- ³ **Liu Z, Ogejo JA, Pruden A, Knowlton KF** (2011) Occurrence, fate and removal of synthetic oral contraceptives (SOCs) in the natural environment: A review. *Sci Total Environ* 409:5149–5161.
- ⁴ **Can ZS, Firlak M, Kerç A, Evcimen S** (2014) Evaluation of different wastewater treatment techniques in three WWTPs in Istanbul for the removal of selected EDCs in liquid phase. *Environ Monit Assess* 186:525-539.
- ⁵ **Jenkins RL, Wilson EM, Angus RA, Howell WM, Kirk M** (2003) Androstenedione and progesterone in the sediment of a river receiving paper mill effluent. *Toxicol Sci* 73:53-9.
- ⁶ **Orlando EF, Ellestad LE** (2014) Sources, concentrations, and exposure effects of environmental gestagens on fish and other aquatic wildlife, with an emphasis on reproduction. *Gen Comp Endocrinol* 203:241-249.
- ⁷ **Richardson ML, Bowron JM** (1985) The fate of pharmaceutical chemicals in the aquatic environment. *J Pharm Pharmacol* 37:1-12.
- ⁸ **Runnalls TJ, Beresford N, Kugathas S, Margiotta-Casaluci L, Scholze M, Scott AP, Sumpter JP** (2015) From single chemicals to mixtures - Reproductive effects of levonorgestrel and ethinylestradiol on the fathead minnow. *Aquat Toxicol* 169:152-167.
- ⁹ **Fent K** (2015) Progestins as endocrine disrupters in aquatic ecosystems: Concentrations, effects and risk assessment. *Environ Int* 84:115-130.
- ¹⁰ **Santos LH, Araujo AN, Fachini A, Pena A, Delerue-Matos C, Montenegro MC** (2010) Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *J Hazard Mater* 175:45-95.
- ¹¹ **Runnalls TJ, Beresford N, Losty E, Scott AP, Sumpter JP** (2013) Several synthetic progestins with different potencies adversely affect reproduction of fish. *Environ Sci Technol* 47, 2077-2084.
- ¹² **Säfholm M, Jansson E, Fick J, Berg C** (2015) Mixture effects of levonorgestrel and ethinylestradiol: estrogenic biomarkers and hormone receptor mRNA expression during sexual programming. *Aquat Toxicol* 161:146-53.
- ¹³ **Caldwell DJ, Mastrocco F, Hutchinson TH, Lange R, Heijerick D, Janssen C, ... Sumpter JP** (2008) Derivation of an aquatic predicted no-effect concentration for the synthetic hormone, 17 alpha-ethinyl estradiol. *Environ Sci Technol* 42:7046-7054.
- ¹⁴ **Kunz PY, Fent K** (2006) Estrogenic activity of UV filter mixtures. *Toxicol Appl Pharmacol* 217:86–99.
- ¹⁵ **Soverchia L, Ruggeri B, Palermo F, Mosconi G, Cardinaletti G, Scortichini G, ... Polzonetti-Magni AM** (2005) Modulation of vitellogenin synthesis through estrogen receptor beta-1 in goldfish (*Carassius auratus*) juveniles exposed to 17-beta estradiol and nonylphenol. *Toxicol Appl Pharmacol* 209:236-43.

- ¹⁶ **Contardo-Jara V, Lorenz C, Pflugmacher S, Nutzmann G, Kloas W, Wiegand C** (2011) Molecular effects and bioaccumulation of levonorgestrel in the non-target organism *Dreissena polymorpha*. *Environ Pollut* 159:38-44.
- ¹⁷ **Fick J, Lindberg RH, Parkkonen J, Arvidsson B, Tysklind M, Larsson DGJ** (2010) Therapeutic levels of levonorgestrel detected in blood plasma of fish: results from screening rainbow trout exposed to treated sewage effluents. *Environ Sci Technol* 44:2661–6.
- ¹⁸ **Baulieu E, Schumacher M** (2000) Progesterone as a neuroactive neurosteroid, with special reference to the effect of progesterone on myelination. *Steroids* 65:605-612.
- ¹⁹ **Zucchi S, Mirbahai L, Castiglioni S, Fent K** (2014) Transcriptional and physiological responses induced by binary mixtures of drospirenone and progesterone in zebrafish (*Danio rerio*). *Environ Sci Technol* 48:3523-3531.
- ²⁰ <http://www.ourbodiesourselves.org/health-info/a-brief-history-of-birth-control/> (2017. március 27.)
- ²¹ <http://eletmodszer.com/hirek/az-elso-magyar-fogamzasgato-tabletta.html> (2017. március 27.)
- ²² **Roy S, Mishell DR, Gray G, Dozono-Takano R, Brenner PF, Eide I, ... Shaw ST** (1980) Comparison of metabolic and clinical effects of four oral contraceptive formulations and a contraceptive vaginal ring. *Am J Obstet Gynecol* 136:920-31.
- ²³ **Basdevant A** (1979) Metabolic effects of oral contraceptives: influence of the dosage and nature of the substance used. *Contracept Fertil Sex* (Paris) 4:781-5.
- ²⁴ **Sitruk-Ware R, Nath A** (2010) The use of newer progestins for contraception. *Contraception* 82:410–417.
- ²⁵ **LeBlanc ES, Laws A** (1999) Benefits and Risks of Third-Generation Oral Contraceptives. *J Gen Intern Med* 14: 625–632.
- ²⁶ **Pérez-Campos EF** (2010) Ethinylestradiol/dienogest in oral contraception. *Drugs* 70:681-9.
- ²⁷ **Burke A** (2013) Nomegestrol acetate-17b-estradiol for oral contraception. *Patient Prefer Adherence* 7:607–619.
- ²⁸ http://www.elitmed.hu/ilam/hirvilag/ujabb_generacios_fogamzasgatlak_nagyobb_tro_mboziskockazat_10784/ (2017. március 27.)
- ²⁹ <https://www.treated.com/contraception/what-is-a-1st-2nd-3rd-4th-generation-pill> (2017. március 27.)
- ³⁰ <http://www.iranyelvek.hu/iranyelvek/old/all/nogyogyszer/Fogamzasgatas.pdf> (2017. március 27.)
- ³¹ **Besse JP, Garric J** (2009) Progestagens for human use, exposure and hazard assessment for the aquatic environment. *Environ Pollut* 157:3485–3494.
- ³² **Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PS, Ruddon RW, Goodman AG.** (1996) Goodman and Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics, (9th Ed.) McGraw-Hill Professional, New York, NY.
- ³³ **Rodriguez MI, Warden M, Darney PD** (2010) Intrauterine progestins, progesterone antagonists, and receptor modulators: a review of gynecologic applications. *Am J Obstet Gynecol* 202:420-428.
- ³⁴ **Africander D, Verhoog N, Hapgood JP** (2011) Molecular mechanisms of steroid receptor-mediated actions by synthetic progestins used in HRT and contraception. *Steroids* 76:636–652.
- ³⁵ **Kuhl H** (1996) Comparative pharmacology of newer progestogens. *Drugs* 51:188–215.

-
- ³⁶ **Svensson J, Fick J, Brandt I, Brunström B** (2013) The synthetic progestin levonorgestrel is a potent androgen in the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). *Environ Sci Technol* 47:2043-2051.
- ³⁷ **Svensson J, Fick J, Brandt I, Brunström B** (2014) Environmental concentrations of an androgenic progestin disrupts the seasonal breeding cycle in male three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). *Aquatic Toxicol* 147:84-91.
- ³⁸ **Kumar V, Johnson AC, Trubiroha T, Tumová J, Ihara M, Grabic R, ... Kroupová HK** (2015) The challenge presented by progestins in ecotoxicological research: A critical review. *Environ Sci Technol* 49:2625-38.
- ³⁹ **Stanczyk FZ** (1996) Introduction: structure–function relationships, metabolism, pharmacokinetics and potency of progestins. *Drug Today* 32 Supplement:1–14.
- ⁴⁰ **Stanczyk FZ** (2003) All progestins are not created equal. *Steroids* 68, 879–890.
- ⁴¹ **Stanczyk FZ, Roy S** (1990) Metabolism of levonorgestrel, norethindrone, and structurally related contraceptive steroids. *Contraception* 42, 67–96.
- ⁴² **Kunz PY, Fent K** (2009) Estrogenic activity of ternary UV filter mixtures in fish (*Pimephales promelas*) - an analysis with nonlinear isobolograms. *Toxicol Appl Pharmacol* 234:77-88.
- ⁴³ **Tang T, Qian K, Shi T, Wanga F, Li P, Li J, Cao Y** (2012) Photodegradation of quineestrol in waters and the transformation products by UV irradiation. *Chemosphere* 89:1419–1425.
- ⁴⁴ **Zhang QQ, Zhao JL, Ying GG, Liu YS, Pan CG** (2014) Emission estimation and multimedia fate modeling of seven steroids at the river basin scale in China. *Environ Sci Technol* 48, 7982–7992.
- ⁴⁵ **Liu S, Chen H, Xu XR, Liu SS, Sun KF, Zhao JL, Ying GG** (2015) Steroid inmarine aquaculture farms surrounding Hailing Island, South China: occurrence, bioconcentration, and human dietary exposure. *Sci Total Environ* 502:400–407.
- ⁴⁶ **Liu ZH, Kanjo Y, Mizutani S** (2009) Removal mechanisms for endocrine disrupting compounds (EDCs) in wastewater treatment-physical means, biodegradation, and chemical advanced oxidation: a review. *Sci Total Environ* 407:731–49.
- ⁴⁷ **Chang H, Wan Y, Wu S, Fan Z, Hu J** (2011) Occurrence of androgens and progestogens in wastewater treatment plants and receiving river waters: Comparison to estrogens. *Water Res* 45:732-740.
- ⁴⁸ **Aherne GW, English J, Marks V** (1985) The role of immunoassay in the analysis of microcontaminants in water samples. *Ecotox Environ Safe* 9:79-83.
- ⁴⁹ **Yost EE, Meyer MT, Dietze JE, Williams CM, Worley-Davis L, Lee B, Kullman SW** (2014) Transport steroid hormones, phytoestrogens, and estrogenic activity across a swine lagoon/sprayfield system. *Environ Sci Technol* 48:11600–11609.
- ⁵⁰ **Vulliet E, Wiest L, Baudot R, Grenier-Loustalot MF** (2008) Multi-residue analysis of steroids at sub-ng/L levels in surface and ground-waters using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1210:84–91.
- ⁵¹ **Liu S, Ying GG, Zhao JL, Zhou LJ, Yang B, Chen ZF, Lai HJ** (2012) Occurrence and fate of androgens, estrogens, glucocorticoids and progestagens in two different types of municipal wastewater treatment plants. *J Environ Monit* 14, 482-491.
- ⁵² **Liu, SS, Ying GG, Liu S, Lai HJ, Chen ZF, Pan CG, ... Chen J** (2014) Analysis of 21 progestagens in various matrices by ultra-high-performance liquid

chromatography tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) with diverse sample pretreatment. *Anal Bioanal Chem* 406:7299-7311.

⁵³ **Avar P, Maasz G, Takacs P, Lovas S, Zrinyi Z, Svigruha R, ... Pirger Z** (2016) HPLC-MS/MS analysis of steroid hormones in environmental water samples. *Drug Test Anal* 8, 124-128.

⁵⁴ **Dang Z, Cheng Y, Chen H, Cui Y, Yin H, Traas T,... Vermeire T** (2012) Evaluation of the *Daphnia magna* reproduction test for detecting endocrine disruptors. *Chemosphere* 88:514–23.

⁵⁵ **Ducrot V, Askem C, Azam D, Brettschneider D, Brown R, Charles S, ... Lagadic L** (2014) Development and validation of an OECD reproductive toxicity test guideline with the pond snail *Lymnaea stagnalis* (Mollusca, Gastropoda). *Regul Toxicol Pharmacol* 70:605-14.

⁵⁶ **Kloas W, Urbatzka R, Opitz R, Würtz S, Behrends T, Hermelink B, ... Lutz I** (2009) Endocrine disruption in aquatic vertebrates. *Ann N Y Acad Sci* 1163:187-200.

⁵⁷ **Zhao Y, Castiglioni S, Fent K** (2015) Environmental progestins progesterone and drospirenone alter the circadian rhythm network in zebrafish (*Danio rerio*). *Environ Sci Technol* 49:10155-64.

⁵⁸ **Bandow C, Weltje L** (2012) Development of an embryo toxicity test with the pond snail *Lymnaea stagnalis* using the model substance tributyltin and common solvents. *Sci Total Environ* 435-436:90-5.

⁵⁹ **Czech P, Weber K, Dietrich DR** (2001) Effects of endocrine modulating substances on reproduction in the hermaphroditic snail *Lymnaea stagnalis* L. *Aquat Toxicol* 53:103-14.

⁶⁰ **Ducrot V, Teixeira-Alves M, Lopes C, Delignette-Muller ML, Charles S, Lagadic L** (2010) Development of partial life-cycle experiments to assess the effects of endocrine disruptors on the freshwater gastropod *Lymnaea stagnalis*: a case study with vinclozolin. *Ecotoxicology* 19:1312–1321.

⁶¹ **Giusti A, Leprince P, Mazzucchelli G, Thomé JP, Lagadic L, Ducrot V, Joaquim-Justo C** (2013) Proteomic analysis of the reproductive organs of the hermaphroditic gastropod *Lymnaea stagnalis* exposed to different endocrine disrupting chemicals. *PLoS One* 8:e81086.

⁶² **Giusti A, Lagadic L, Barsi A, Thomé JP, Joaquim-Justo C, Ducrot V** (2014) Investigating apical adverse effects of four endocrine active substances in the freshwater gastropod *Lymnaea stagnalis*. *Sci Total Environ* 493:147-55.

⁶³ **Haeba MH, Hilscherová K, Mazurová E, Bláha L** (2008) Selected endocrine disrupting compounds (vinclozolin, flutamide, ketoconazole and dicofol): effects on survival, occurrence of males, growth, molting and reproduction of *Daphnia magna*. *Environ Sci Pollut Res Int* 15:222-27.

⁶⁴ **Snell TW, DesRosiers NJD** (2008) Effect of progesterone on sexual reproduction of *Brachionus manjavacas* (Rotifera). *J Exp Mar Biol Ecol* 363:104-109.

⁶⁵ **Somoza GM, Miranda LA, Strobl-Mazzulla P, Guilgur LG** (2002) Gonadotropin-releasing hormone (GnRH): from fish to mammalian brains. *Cell Mol Neurobiol* 22:589-609.

⁶⁶ **Lorenz C, Contardo-Jara V, Trubiroha A, Krüger A, Viehmann V, Wiegand C, ... Kloas W** (2011) The synthetic gestagen levonorgestrel disrupts sexual development in *Xenopus laevis* by affecting gene expression of pituitary gonadotropins and gonadal steroidogenic enzymes. *Toxicol Sci* 124:311-9.

⁶⁷ **Kroupova HK, Trubiroha A, Lorenz C, Contardo-Jara V, Lutz I, Grabic R, ... Kloas W** (2014) The progestin levonorgestrel disrupts gonadotropin expression and sex steroid levels in pubertal roach (*Rutilus rutilus*). *Aquat Toxicol* 154:154-62.

-
- ⁶⁸ **Kvarnryd M, Grabic R, Brandt I, Berg C** (2011) Early life progestin exposure causes arrested oocyte development, oviductal agenesis and sterility in adult *Xenopus tropicalis* frogs. *Aquat Toxicol* 103:18-24.
- ⁶⁹ **Zeilinger J, Steger-Hartmann T, Maser E, Goller S, Vonk R, Länge R** (2009) Effects of synthetic gestagens on fish reproduction. *Environ Toxicol Chem* 28:2663-70.
- ⁷⁰ **Overturf MD, Overturf CL, Carty DR, Hala D, Huggett DB** (2014) Levonorgestrel exposure to fathead minnows (*Pimephales promelas*) alters survival, growth, steroidogenic gene expression and hormone production. *Aquat Toxicol* 148:152-61.
- ⁷¹ **Dehennaut V, Lefebvre T, Sellier C, Leroy Y, Gross B, Walker S, ... Bodart JF** (2007) O-linked N-acetylglucosaminyltransferase inhibition prevents G2/M transition in *Xenopus laevis* oocytes. *J Biol Chem* 282:12527-36.
- ⁷² **Babin PJ, Carnevali O, Lubzens E, Schneider WJ** (2007) Molecular aspects of oocyte vitellogenesis in fish. In Babin PJ, Cerdà J, Lubzens E (Eds) *The Fish Oocyte: From Basic Studies to Biotechnological Applications*. Springer 39–76.
- ⁷³ **Dreon M, Lavarias S, Garin CF, Heras H, Pollero RJ** (2002) Synthesis, distribution, and levels of an egg lipoprotein from the apple snail *Pomacea canaliculata* (Mollusca: Gastropoda). *J Exp Zool* 292:323-30.
- ⁷⁴ **Jubeaux G, Simon R, Salvador A, Queau H, Chaumot A, Geffard O** (2012) Vitellogenin-like proteins in the freshwater amphipod *Gammarus fossarum* (Koch, 1835): functional characterization throughout reproductive process, potential for use as an indicator of oocyte quality and endocrine disruption biomarker in males. *Aquat Toxicol* 112-113:72-82.
- ⁷⁵ **Pertseva MN, Shapkov AO** (2002) Conservatism of the insulin signaling system in evolution of invertebrate and vertebrate animals. *J Evol Biochem Phys+* 38: 547-561.
- ⁷⁶ **Plows LD, Cook RD, Davies AJ, Walker AJ** (2006) Phagocytosis by *Lymnaea stagnalis* haemocytes: A potential role for phosphatidylinositol 3-kinase but not protein kinase A. *J Invertebr Pathol* 91: 74–77.
- ⁷⁷ **Zelck UE, Gege BE, Schmid S** (2007) Specific inhibitors of mitogen-activated protein kinase and PI3-K pathways impair immune responses by hemocytes of trematode intermediate host snails. *Dev Comp Immunol* 31: 321-331.
- ⁷⁸ **Alessi DR, Cohen P** (1998) Mechanism of activation and function of protein kinase B. *Curr Opin Genet Dev* 8:55-62.
- ⁷⁹ **Oldham S, Montagne J, Radimerski T, Thomas G, Hafen E** (2000) Genetic and biochemical characterization of dTOR, the *Drosophila* homolog of the target of rapamycin. *Genes Dev* 14:2689-94.
- ⁸⁰ **Dehennaut V, Lefebvre T, Leroy Y, Vilain JP, Michalski JC, Bodart JF** (2009) Survey of O-GlcNAc level variations in *Xenopus laevis* from oogenesis to early development. *Glycoconj J* 26:301-11.
- ⁸¹ **Badisco L, Van Wielendaele P, Vanden Broeck J** (2013) Eat to reproduce: a key role for the insulin signaling pathway in adult insects. *Front Physiol* 4: article 202.
- ⁸² **Miracle A, Ankley G, Lattier D** (2006) Expression of two vitellogenin genes (vg1 and vg3) in fathead minnow (*Pimephales promelas*) liver in response to exposure to steroidal estrogens and androgens. *Ecotoxicol Environ Saf* 63:337-342.
- ⁸³ **Kokokiris L, Fostier A, Athanassopoulou F, Petridis D, Kentouri M** (2006) Gonadal changes and blood sex steroids levels during natural sex inversion in the protogynous Mediterranean red porgy, *Pagrus pagrus* (Teleostei: Sparidae). *Gen Comp Endocrinol* 149:42-48.

- ⁸⁴ **Gagnaire B, Gagne F, Andre C, Blaise C, Abbaci K, Budzinski H, ... Garric J** (2009) Development of biomarkers of stress related to endocrine disruption in gastropods: alkali-labile phosphates, protein-bound lipids and vitellogenin-like proteins. *Aquat Toxicol* 92:155-67.
- ⁸⁵ **Matozzo V, Marin MG** (2008) Can 17-beta estradiol induce vitellogenin-like proteins in the clam *Tapes philippinarum*? *Environ Toxicol Phar* 26:38-44.
- ⁸⁶ **Shilling AD, Williams DE** (2000) The non-aromatizable androgen, dihydrotestosterone, induces antiestrogenic responses in the rainbow trout. *J Steroid Biochem Mol Biol* 74:187-94.
- ⁸⁷ **Zhang G, Fang X, Guo X, Li L, Luo R, Xu F, ... Wang J** (2012) The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature* 490:49-54.
- ⁸⁸ **Maasz G, Zrinyi Z, Reglodi D, Petrovics D, Rivnyak A, Kiss T, ... Pirger Z** (2017) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) has a neuroprotective function in dopamine-based neurodegeneration in rat and snail parkinsonian models. *Dis Model Mech* 10:127-139.
- ⁸⁹ **Culleton BA, Lall P, Kinsella GK, Doyle S, McCaffrey J, Fitzpatrick DA, Burnell AM** (2015) A role for the Parkinson's disease protein DJ-1 as a chaperone and antioxidant in the anhydrobiotic nematode *Panagrolaimus superbus*. *Cell Stress Chaperones* 20:121-37.
- ⁹⁰ **Hewitt VL, Whitworth AJ** (2017) Mechanisms of Parkinson's Disease: Lessons from *Drosophila*. In L Pick (Ed), *Fly Models of Human Diseases* (1st ed., old. 173-200) Elsevier, Amsterdam, Hollandia.
- ⁹¹ **Faust K, Gehrke S, Yang Y, Yang L, Beal MF, Lu B** (2009) Neuroprotective effects of compounds with antioxidant and anti-inflammatory properties in a *Drosophila* model of Parkinson's disease. *BMC Neurosci* 10:109.
- ⁹² **Lin J, Prahlad J, Wilson MA** (2012) Conservation of oxidative protein stabilization in an insect homologue of parkinsonism-associated protein DJ-1. *Biochemistry* 51:3799-807.
- ⁹³ **Ansai S, Sakuma T, Yamamoto T, Ariga H, Uemura N, Takahashi R, Kinoshita M** (2013) Efficient targeted mutagenesis in medaka using custom-designed transcription activator-like effector nucleases. *Genetics* 193:739-749.
- ⁹⁴ **Li HM, Taira T, Maita C, Ariga H, Iguchi-Ariga SM** (2006) Protection against nonylphenol-induced cell death by DJ-1 in cultured Japanese medaka (*Oryzias latipes*) cells. *Toxicology* 228:229-238.
- ⁹⁵ **Bai Q, Mullett SJ, Garver JA, Hinkle DA, Burton EA** (2006) Zebrafish DJ-1 is evolutionarily conserved and expressed in dopaminergic neurons. *Brain Res* 1113:33-44.
- ⁹⁶ **Bretaud S, MacRaild S, Ingham PW, Bandmann O** (2011) The influence of the zebrafish genetic background on Parkinson's disease-related aspects. *Zebrafish* 8:103-108.
- ⁹⁷ **Shinbo Y, Niki T, Taira T, Ooe H, Takahashi-Niki K, Maita C, ... Ariga H** (2006) Proper SUMO-1 conjugation is essential to DJ-1 to exert its full activities. *Cell Death Differ* 13:96-108.
- ⁹⁸ **Leong JS, Jantzen SG, von Schalburg KR, Cooper GA, Messmer AM, Liao NY, ... Koop BF** (2010) *Salmo salar* and *Esox lucius* full-length cDNA sequences reveal changes in evolutionary pressures on a post-tetraploidization genome. *BMC Genomics* 11:279.

- ⁹⁹ **Zhang G, Li C, Li Q, Li B, Larkin DM, Lee C, ... Wang J** (2014) Comparative genomics reveals insights into avian genome evolution and adaptation. *Science* 346:1311-20.
- ¹⁰⁰ **Clements CM, McNally RS, Conti BJ, Mak TW, Ting JP** (2006) DJ-1, a cancer- and Parkinson's disease-associated protein, stabilizes the antioxidant transcriptional master regulator Nrf2. *PNAS* 103:15091-15096.
- ¹⁰¹ **Schultz MA, Hagan SS, Datta A, Zhang Y, Freeman ML, Sikka SC, ... Mondal D** (2014) Nrf1 and Nrf2 transcription factors regulate androgen receptor transactivation in prostate cancer cells. *PLoS ONE* 9:e87204.
- ¹⁰² **Dong X, Shynlova O, Challis JR, Lye SJ** (2016) Identification and characterization of the protein-associated splicing factor as a negative co-regulator of the progesterone receptor. *J Biol Chem* 291:6609.
- ¹⁰³ **Xu J, Zhong N, Wang H, Elias JE, Kim CY, Woldman I, ... Yankner BA** (2005) The Parkinson's disease-associated DJ-1 protein is a transcriptional co-activator that protects against neuronal apoptosis. *Hum Mol Genet* 14:1231-41.
- ¹⁰⁴ **Yamaguchi S, Yamane T, Takahashi-Niki K, Kato I, Niki T, Goldberg MS, ... Ariga H** (2012) Transcriptional activation of low-density lipoprotein receptor gene by DJ-1 and effect of DJ-1 on cholesterol homeostasis. *PLoS ONE* 7:e38144.
- ¹⁰⁵ **Niki T, Takahashi-Niki K, Taira T, Iguchi-Ariga SM, Ariga H** (2003) DJBP: A novel DJ-1-binding protein, negatively regulates the androgen receptor by recruiting histone deacetylase complex, and DJ-1 antagonizes this inhibition by abrogation of this complex. *Mol Cancer Res* 1:247-61.
- ¹⁰⁶ **Takahashi K, Taira T, Niki T, Seino C, Iguchi-Ariga SM, Ariga H** (2001) DJ-1 positively regulates the androgen receptor by impairing the binding of PIASx alpha to the receptor. *J Biol Chem* 276:37556-563.
- ¹⁰⁷ <http://molluscs.at/gastropoda/index.html?/gastropoda/freshwater/lymnaea.html> (2017. március 29).
- ¹⁰⁸ **Koene JM** (2010) Neuro-endocrine control of reproduction in hermaphroditic freshwater snails: mechanisms and evolution. *Front Behav Neurosci* 4: article 167.
- ¹⁰⁹ **Mescheriakov VN** (1990) Animal species for developmental studies. In: Detlaff DA, Vassetzky SCJ (Eds.) *The common pond snail, Lymnaea stagnalis*. (1st ed, old. 69-132.) Plenum Press, New York-London.
- ¹¹⁰ **Morill JB** (1982) Developmental biology of the freshwater invertebrates. In: Harrison FW, Cowden RR (Eds.), *Development of the pulmonate gastropod, Lymnaea*. (1st ed, old. 399-483.) New York.
- ¹¹¹ **Nakadera Y, Swart EM, Maas JP, Montagne-Wajer K, Ter Maat A, Koene JM** (2015) Effects of age, size, and mating history on sex role decision of a simultaneous hermaphrodite. *Behav Ecol* 26:232-41.
- ¹¹² <http://www.scholarpedia.org/article/Lymnaea> (2017. március 29.)
- ¹¹³ **Scott AP** (2012) Do mollusks use vertebrate sex steroids as reproductive hormones? Part I: Critical appraisal of the evidence for the presence, biosynthesis and uptake of steroids. *Steroids* 77:1450-68.
- ¹¹⁴ **Altelaar AF, van Minnen J, Jimenez CR, Heeren RM, Piersma SR** (2005) Direct molecular imaging of *Lymnaea stagnalis* nervous tissue at subcellular spatial resolution by mass spectrometry. *Anal Chem* 77:735-41.
- ¹¹⁵ **de Jong-Brink M, Schot LP, Schoenmakers HJ, Bergamin-Sassen MJ** (1981) A biochemical and quantitative electron microscope study on steroidogenesis in ovotestis and digestive gland of the pulmonate snail *Lymnaea stagnalis*. *Gen Comp Endocrinol* 45:30-8.

- ¹¹⁶ **Fernandes D, Loi B, Porte C** (2011) Biosynthesis and metabolism of steroids in molluscs. *J Steroid Biochem Mol Biol* 127:189-95.
- ¹¹⁷ **Davison A, Frend HT, Moray C, Wheatley H, Searle HJ, Eichhorn MP** (2009) Mating behaviour in *Lymnaea stagnalis* pond snails is a maternally inherited, lateralized trait. *Biol Lett* 5:20-22.
- ¹¹⁸ **Ferguson GP, Benjamin PR** (1991) The whole-body withdrawal response of *Lymnaea stagnalis*. I. Identification of central motoneurons and muscles. *J Exp Biol* 158:63-95.
- ¹¹⁹ **Ter Maat A, Geraerts WPM, Jansen RF, Bos NPA** (1988) Chemically mediated positive feedback generates long-lasting discharge in the molluscan neuroendocrine system. *Brain Res* 438:77-82.
- ¹²⁰ **Ulloa-Aguirre A** (2000) Biochemical and functional aspects of gonadotrophin-releasing hormone and gonadotrophins. *Reprod Biomed Online* 2:48-62.
- ¹²¹ **Stewart MJ, Favrel P, Rotgans BA, Wang T, Zhao M, ...Cummins SF** (2014) Neuropeptides encoded by the genomes of the *Akoya pearl* oyster *Pinctata fucata* and Pacific oyster *Crassostrea gigas*: a bioinformatic and peptidomic survey. *BMC Genomics* 15:840.
- ¹²² <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (2017. március 29.)
- ¹²³ **Young KG, Chang JP, Goldberg JI** (1999) Gonadotropin-releasing hormone neuronal system of the freshwater snails *Helisoma trivolvis* and *Lymnaea stagnalis*: possible involvement in reproduction. *J Comp Neurol* 404:427-37.
- ¹²⁴ **Osada M, Treen N** (2013) Molluscan GnRH associated with reproduction. *Gen Comp Endocrinol* 181:254-8.
- ¹²⁵ **Nakadera Y, Swart EM, Hoffer JN, den Boon O, Ellers J, Koene JM** (2014) Receipt of seminal fluid proteins causes reduction of male investment in a simultaneous hermaphrodite. *Curr Biol* 24:859-62.
- ¹²⁶ Dr. Harka Ákos, Sallai Zoltán (2007) A halak szervezete – Kiválasztás. In Dr. Harka Ákos és Sallai Zoltán (Eds) Magyarország halfaunája. Digitális Tankönyvtár. <http://www.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tkt/magyarorszag-halfaunaja/ch05s11.html> (2017. március 29.)
- ¹²⁷ **Szathmári L** (2011) A halak biológiai sajátosságai. In Ördög V, Hancz Cs, Bercsényi M, Szathmári L, Havasi M (Eds) *Haltenyésztés*. Nyugat-Magyarországi Egyetem; Pannon Egyetem; Kaposvári Egyetem TÁMOP 4.2.5 könyvei.
- ¹²⁸ **Nagahama Y, Yamashita M** (2008) Regulation of oocyte maturation in fish. *Dev Growth Differ* 50 Suppl 1:S195-219.
- ¹²⁹ **Tubbs C, Thomas P** (2009) Progesterin signaling through an olfactory G protein and membrane progesterin receptor-alpha in Atlantic croaker sperm: potential role in induction of sperm hypermotility. *Endocrinology* 150:473-84.
- ¹³⁰ **Tang H, Liu Y, Li J, Yin Y, Li G, Chen Y, ... Cheng CH** (2016) Gene knockout of nuclear progesterone receptor provides insights into the regulation of ovulation by LH signaling in zebrafish. *Sci Rep* 6:28545.
- ¹³¹ **Sugimoto A, Oka K, Sato R, Adachi S, Baker ME, Katsu Y** (2016) Corticosteroid and progesterone transactivation of mineralocorticoid receptors from Amur sturgeon and tropical gar. *Biochem J* 473:3655-65.
- ¹³² **Svensson J, Mustafa A, Fick J, Schmitz M, Brunström B** (2016) Developmental exposure to progestins causes male bias and precocious puberty in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat Toxicol* 177:316-23.
- ¹³³ **Geraudie P, Gerbron M, Hill E, Minier C** (2009) Roach (*Rutilus rutilus*) reproductive cycle: a study of biochemical and histological parameters in a low contaminated site. *Fish Physiol Biochem* 36:767-77.

-
- ¹³⁴ **Svatos A** (2011) Single-cell metabolomics comes of age: new developments in mass spectrometry profiling and imaging. *Anal Chem* 83:5037-5044.
- ¹³⁵ **Zhang L, Foreman DP, Grant PA, Shrestha B, Moody SA, ... Vertes A** (2014) In situ metabolic analysis of single plant cells by capillary microsampling and electrospray ionization mass spectrometry with ion mobility separation. *Analyst* 139:5079-85.
- ¹³⁶ **de Graef MR, Alexeeva S, Snoep JL, Teixeira de Mattos MJ** (1999) The steady-state internal redox state (NADH/NAD) reflects the external redox state and is correlated with catabolic adaptation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 181:2351-57.
- ¹³⁷ **Zhang L, Vertes A** (2015) Energy charge, redox state, and metabolite turnover in single human hepatocytes revealed by capillary microsampling mass spectrometry. *Anal Chem* 87:10397-405.
- ¹³⁸ **Obrosova IG, Stevens MJ** (1999) Effect of dietary taurine supplementation on GSH and NAD(P)-redox status, lipid peroxidation, and energy metabolism in diabetic precataractous lens. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40:680-688.
- ¹³⁹ **Bottke W** (1986) Immunolocalization of ferritin polypeptides in oocytes and somatic tissue of the freshwater snails *Lymnaea stagnalis* and *Planorbarius corneus*. *Cell Tissue Res* 243:397-404.
- ¹⁴⁰ **Barre P, Bride M, Beliard R, Petracca B** (1991) Localization of yolk proteins and their possible precursors using polyclonal and monoclonal antibodies, in *Helix aspersa*. *Cell Mol Biol* 37:639-50.
- ¹⁴¹ **Miksys S, Saleuddin ASM** (1986) Ferritin as an exogenously derived yolk protein in *Helisoma duryi* (Mollusca: Pulmonata). *Can J Zool* 64:2678-82.
- ¹⁴² **Goldberg JI, Garofalo R, Price CJ, Chang JP** (1993) Presence and biological activity of a GnRH-like factor in the nervous system of *Helisoma trivolvis*. *J Comp Neurol* 336:571-82.
- ¹⁴³ **Nuurai P, Poljaroen J, Tinikul Y, Cummins S, Sretarugsa P, Hanna P, ... Sobhon P** (2010) The existence of gonadotropin-releasing hormone-like peptides in the neural ganglia and ovary of the abalone, *Haliotis asinina* L. *Acta Histochem* 112:557-66.
- ¹⁴⁴ **Jiménez CR, Spijker S, de Schipper S, Lodder JC, Janse CK, Geraerts WP, ... Li K** (2006) Peptidomics of a single identified neuron reveals diversity of multiple neuropeptides with convergent actions on cellular excitability. *J Neurosci* 26:518-29.
- ¹⁴⁵ **Antkowiak T, Chase R** (2003) Sensory innervation of the ovotestis in the snail *Helix aspersa*. *J Exp Biol* 206:3913-21.
- ¹⁴⁶ **Ter Maat A, Pieneman AW, Goldschmeding JT, Smelik WFE, Ferguson GP** (1989) Spontaneous and induced egg laying behavior of the pond snail, *Lymnaea stagnalis*. *J Comp Physiol A* 164:673-83.
- ¹⁴⁷ **Hermann PM, de Lange RP, Pieneman AW, ter Maat A, Jansen RF** (1997) Role of neuropeptides encoded on CDCH-1 gene in the organization of egg-laying behavior in the pond snail, *Lymnaea stagnalis*. *J Neurophysiol* 78:2859-69.
- ¹⁴⁸ **Ferguson GP, Pieneman AW, Jansen RF, Ter Maat A** (1993) Neuronal feedback in egg laying behavior of the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *J Exp Biol* 178:251-59.
- ¹⁴⁹ **van Minnen J, vd Haar C, Raap AK, Vreugdenhil E** (1988) Localization of ovulation hormone-like neuropeptide in the central nervous system of the snail *Lymnaea stagnalis* by means of immunocytochemistry and in situ hybridization. *Cell Tissue Res* 251:477-84.
- ¹⁵⁰ **Murack PJ, Parrish J, Barry TP** (2011) Effects of progesterone on sperm motility in fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Aquat Toxicol* 104:121-5.

- ¹⁵¹ **Yeung WS, Chiu PC, Wang CH, Yao YQ, Ho PC** (2002) The effects of levonorgestrel on various sperm functions. *Contraception* 66:453-7.
- ¹⁵² **DeQuattro ZA, Peissig EJ, Antkiewicz DS, Lundgren EJ, Hedman CJ, Hemming JD, Barry TP** (2012) Effects of progesterone on reproduction and embryonic development in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environ Toxicol Chem* 31:851-6.
- ¹⁵³ **Christen V, Crettaz P, Oberli-Schrammli A, Fent K** (2012) Antiandrogenic activity of phthalate mixtures: validity of concentration addition. *Toxicol Appl Pharmacol* 259:169-76.
- ¹⁵⁴ **Nishimoto S, Nishida E** (2006) MAPK signalling: ERK5 versus ERK1/2. *EMBO Rep* 7:782-86.
- ¹⁵⁵ **Paoli P, Giannoni E, Chiarugi P** (2013) Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression. *Biochim Biophys Acta* 1833:3481-98.
- ¹⁵⁶ **Shepherd PR, Withers DJ, Siddle K** (1998) Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling. *Biochem J* 333:471-490.
- ¹⁵⁷ **Syrovatkina V, Alegre KO, Dey R, Huang XY** (2016) Regulation, signaling, and physiological functions of G-proteins. *J Mol Biol* 428:3850-68.
- ¹⁵⁸ **Pak E, Segal RA** (2016) Hedgehog signal transduction: Key players, oncogenic drivers, and cancer therapy. *Dev Cell* 38:333-44.
- ¹⁵⁹ **Tills O, Rundle SD, Spicer JI** (2013) Parent-offspring similarity in the timing of developmental events: an origin of heterochrony? *Proc Biol Sci* 280:20131479.
- ¹⁶⁰ **Baldini SF, Steenackers A, Olivier-Van Stichelen S, Mir AM, Mortuaire M, Lefebvre T, Guinez C** (2016) Glucokinase expression is regulated by glucose through O-GlcNAc glycosylation. *Biochem Biophys Res Commun* 478:942-48.
- ¹⁶¹ **Damerow S, Hoppe C, Bandini G, Zarnovican P, Buettner FF, Luder CG, ... Routier FH** (2015) Depletion of UDP-glucose and UDP-galactose using a degron system leads to growth cessation of *Leishmania major*. *PLoS Negl Trop Dis* 9: e0004205.
- ¹⁶² **Fraga A, Ribeiro L, Lobato M, Santos V, Silva JR, ... da Fonseca RN** (2013) Glycogen and glucose metabolism are essential for early embryonic development of the red flour beetle *Tribolium castaneum*. *PloS one* 8: e65125.
- ¹⁶³ **Pyla R, Pichavaram P, Fairaq A, Park MA, Kozak M, Kamath V, ... Segar L** (2015) Altered energy state reversibly controls smooth muscle contractile function in human saphenous vein during acute hypoxia-reoxygenation: Role of glycogen, AMP-activated protein kinase, and insulin-independent glucose uptake. *Biochem Pharmacol* 97:77-88.
- ¹⁶⁴ **Yi DG, Huh WK** (2015) PKA, PHO and stress response pathways regulate the expression of UDP-glucose pyrophosphorylase through Msn2/4 in budding yeast. *FEBS Lett* 589:2409-16.
- ¹⁶⁵ **Han CC, Ma Y, Li Y, Wang Y, Wei W** (2016) Regulatory effects of GRK2 on GPCRs and non-GPCRs and possible use as a drug target (Review). *Int J Mol Med* 38:987-94.
- ¹⁶⁶ **Wei A, Fan B, Zhao Y, Zhang H, Wang L, Yu X, ... Wang S** (2016) ST6Gal-I overexpression facilitates prostate cancer progression via the PI3K/Akt/GSK-3beta/beta-catenin signaling pathway. *Oncotarget* 7:65374-88.
- ¹⁶⁷ **Zhang B, Lai G, Wu J, Sun R, Xu R, Yang X, ... Zhao Y** (2016) 20-HETE attenuates the response of glucose-stimulated insulin secretion through the AKT/GSK-3beta/Glut2 pathway. *Endocrine* 54:371-82.
- ¹⁶⁸ **Wells L, Vosseller K, Hart GW** (2003) A role for N-acetylglucosamine as a nutrient sensor and mediator of insulin resistance. *Cell Mol Life Sci* 60:222-28.

- ¹⁶⁹ **Park Y, Zhang Z, Laremore TN, Li B, Sim JS, Im AR, ... Linhardt RJ** (2008) Variation of acharan sulfate and monosaccharide composition and analysis of neutral N-glycans in African giant snail (*Achatina fulica*). *Glycoconj J* 25:863-77.
- ¹⁷⁰ **Lefler KK** (2010) Természetesvízi halfajok ivari ciklusának vizsgálata. *Doktori értekezés*. Szent István Egyetem, Gödöllő.
- ¹⁷¹ **Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL** (1995) Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:5510-14.
- ¹⁷² **Iyer NV, Kotch LE, Agani F, Leung SW, Laughner E, Wenger RH, ... Semenza GL** (1998) Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes Dev* 12:149-162.
- ¹⁷³ **Semenza GL** (2010) HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. *Curr Opin Genet Develop* 20:51-56.
- ¹⁷⁴ **Oldham WM, Clish CB, Yang Y, Loscalzo J** (2015) Hypoxia-mediated increases in L-2-hydroxyglutarate coordinate the metabolic response to reductive stress. *Cell Metabolism* 22:291-303.
- ¹⁷⁵ **Shamir R, Hartman C, Karry R, Pavlotzky E, Eliakim R, Lachter J, ... Aviram M** (2005) Paraoxonases (PONs) 1, 2, and 3 are expressed in human and mouse gastrointestinal tract and in Caco-2 cell line: Selective secretion of PON1 and PON2. *Free Radical Bio Med* 39:336-44.
- ¹⁷⁶ **Eckert RL, Efimova T, Balasubramanian S, Crish JF, Bone F, Dashti S** (2003) p38 mitogen-activated protein kinases on the body surface - A function for p38 delta. *J Invest Dermatol* 120:823-28.
- ¹⁷⁷ **Grossi V, Peserico A, Tezil T, Simone C** (2014) p38 alpha MAPK pathway: A key factor in colorectal cancer therapy and chemoresistance. *World Gastroenterol* 20:9744-58.
- ¹⁷⁸ **Maxwell MM, Tomkinson EM, Nobles J, Wizeman JW, Amore AM, Quinti L, ... Kazantsev AG** (2011) The Sirtuin 2 microtubule deacetylase is an abundant neuronal protein that accumulates in the aging CNS. *Hum Mol Genet* 20:3986-96.
- ¹⁷⁹ **Baeuerle PA** (1991) The inducible transcription activator NF-kappa B: regulation by distinct protein subunits. *Biochim Biophys Acta* 1072:63-80.
- ¹⁸⁰ **Huang H, McIntosh AL, Landrock KK, Landrock D, Storey SM, Martin GG, ... Schroeder F** (2015) Human FABP1 T94A variant enhances cholesterol uptake. *Biochim Biophys Acta* 1851:946-55.
- ¹⁸¹ **Shi J, Zhang Y, Gu W, Cui B, Xu M, Yan Q, ... Hong J** (2012) Serum liver fatty acid binding protein levels correlate positively with obesity and insulin resistance in Chinese young adults. *PLoS One* 7: e48777.
- ¹⁸² **Peng XE, Wu YL, Zhu YB, Huang RD, Lu QQ, Lin X** (2015) Association of a human FABP1 gene promoter region polymorphism with altered serum triglyceride levels. *PLoS One* 10: e0139417.
- ¹⁸³ **Pechenino AS, Frick KM** (2009) The effects of acute 17beta-estradiol treatment on gene expression in the young female mouse hippocampus. *Neurobiol Learn Mem* 91:315-22.
- ¹⁸⁴ **Xie J, Tang L, Lu L, Zhang L, Xi L, Liu HC, ... Luo X** (2014) Differential expression of heat shock transcription factors and heat shock proteins after acute and chronic heat stress in Laying chickens (*Gallus gallus*). *PLoS One* 9: e102204.