

Pécsi Tudományegyetem Egészségtudományi Kar

Egészségtudományi Doktori Iskola

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) tézis

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 Képzés (PR-6/2) alprogram

Alprogramvezető:

PROF. DR. BOGNER PÉTER egyetemi tanár

Pécs, 2017

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. Az orális fogamzásgátlók ösztrogén és/vagy progesztogén hatóanyagot tartalmaznak, de a gyógyászatban (pl. hormonpótlás) 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 ösztrogénszennyezést nagymértékben kiszűrik, de nem alkalmasak a progesztogén szennyezés megszüntetésére. Az emberi felhasználásból eredő szennyezés mellett számottevő az ipari eredetű (pl. papírgyárak) és az állattartó telepek elfolyóinak környezetbe bocsátott progesztogén tartalma is. Az elmúlt években ezek a gyógyszermaradványok világszerte az egyik legjobban tanulmányozott szteroid típusú környezetszennyező molekulákká váltak. Richardson és Bowron 1985-ben publikálta az első olyan összefoglaló tanulmányt, ami ng/L koncentrációtartományban említi az ösztrogén és a progesztogén típusú vegyületek eredeti formájának jelenlétét, mint endokrin diszruptorokat (ED) a természetes vizekben. Az analitikai technikák fejlődésével a detektálhatósági szint csökkenésének eredményeként emelkedett a mérhető szex-szteroidok száma. 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.

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. Az elmúlt években publikált ED kutatások többsége az ösztrogén típusú (pl. 17α -etinilösztadiol, 17β -ösztadiol és ösztroin) szennyezés hatásait vizsgálta. 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 - VTG).

Viszonylag kevés irodalmi adat áll azonban rendelkezésre a progesztogének nem-célszervezeteken kifejtett kedvezőtlen élettani hatásairól, pedig azok bioakkumulációja mind gerinctelen (pl. zebra kagyló), mind gerinces (pl. szivárványos pisztráng) édesvízi fajokban ismert. Ezekben a vízi szervezetekben a progesztogének neuroszteroidként fontos szerepet játszanak az agyi folyamatokban is, 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.

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 kockázatbecslésre ad lehetőséget. Ilyen jellegű kísérleteket ösztrogének és/vagy progesztogének egyidejű alkalmazásával, kétkomponensű expozícióval közöltek már korábban. Azonban csak progesztogénekből álló, három- és négykomponensű hormon keverékkel történő kísérletet (PRG, LNG, GES, DRO), környezeti expozíciót modellezve, gerinctelen vagy gerinces tesztállaton ez idáig nem végeztek.

2 Célkitűzések

Az irodalmi áttekintés alapján célul tűztük ki a humán eredetű progesztogén hatóanyag-maradványok élettani hatásának felderítését gerinctelen (*Lymnaea stagnalis*) és gerinces (*Rutilus rutilus*) vízi nem-célszervezeteken egyaránt. 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:

1. Megvizsgáljuk, hogy a VTG, mint az ösztrogénszennyezés biomarkere, alkalmazható-e a progesztogén szennyezések kimutatására.
2. Elemezzük, hogy a DJ-1 védő fehérje alkalmas jelzőmolekula-e progesztogén szennyezések kimutatására.
3. Feltérképezzük a progesztogén kezelés hatását a *L. stagnalis*, mint hermafrodita faj, reprodukciós rendszerében, melynek során, vizsgálni kívánjuk 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.
4. 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 metabolomikai összetételét.
5. 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.

3 Anyagok és módszerek

3.1 Kísérleti állatok és kezelés

A kísérleteinkhez 3-6 hónapos, ivarérett, laboratóriumi tenyészetből származó csigákat (*L. stagnalis*) és a Balaton vízgyűjtő területéhez tartozó Sárvíz patakából (N46.91266 E16.87705) gyűjtött bodorkákat (*R. rutilus*) használtunk. Az állatok kezeléséhez HPLC tisztaságú progeszteron (PRG) (P0130), levonorgesztrel (LNG) (L0551000), drospirenon (DRO) (SML0147) és gesztoden (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 kezelt csoportok hormon koncentrációinak ellenőrzéséhez minden héten mintát vettünk az akváriumi vizekből az aktuális vízcseré előtt és nagy hatékonyságú folyadékkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometria segítségével visszamértük a PRG, LNG, DRO és GES koncentrációt.

A 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 (összesen 55 állatot csoportonként). A kezelési periódus adott pontjain preparáltuk, majd homogenizáltuk (jéghideg 0,2 M-os PBS-ben, pH=7,4, 10 mg szövet 100 μ l-ben) a középbél mirigyét VTG és DJ-1 fehérje

ELISA méréshez, az agy szövetet DJ-1 fehérje ELSIA méréshez, illetve agyszövetet fixáltunk (4% PFA, PB-ben) GnRH immunhisztokémiai megjelenítéséhez. A csigák spermium számának meghatározásához preparáltuk a középbél mirigy proximális felén futó ondóvezetékét a mirigyet borító hártályból való kilépéstől a prosztatába (a vékonyabb, hermafrodita vezetékig) futó szakasz mentén. Ebből nyertük a spermiumokat, melyeket áramlási citometriás vizsgálathoz készítettünk elő (sejtmag jelölés 1 µg/mL Hoechst 33342 festéssel). A felnőtt csigák által rakott petezsákokat 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.

A begyűjtött egészséges, kevert ivarú bodorkákat az egy hónapos akklimatizációs periódus végén négy csoportra osztottuk (összesen n=20 állat csoportonként): kontroll (0,83 µM ciklodextrin), valamint progesztogén keverékkel (PRG, LNG és DRO, mindegyikből 10, 50 és 500 ng/L) kezelt csoportok. A halakat 42 napon át kezeltük, a végén szegfűszeg olajjal elaltattuk, majd dekapitáltuk. Agyukat, veséjükét, májukat és a gonádokat preparáltuk, majd súlyukat lemértük. A mintafeldolgozás ideje alatt jégen tartottuk a szerveket, minimalizálva az enzimatis reakciókat. A szomatikus indexeket a következők szerint számoltuk: [szöveti súly/testsúly]×100. A továbbiakban a halak májszövetét homogenizáltuk (jéghideg 0,2 M-os PBS-ben, pH=7,4, 10 mg szövet 100 µl-ben) VTG ELISA méréshez és DJ-1 fehérje ELISA méréshez, valamint máj és agyszövetet fixáltunk (4% PFA, PB-ben) a DJ-1 fehérje immunhisztokémiai vizsgálatára. A kontroll és az 500 ng/L kezelt csoport egyes állataitól 1 mL vért vettünk zárt vérvételi rendszer segítségével, amelyből szabad koleszterin (CHOL), HDL-, LDL-koleszterint és triglicerideket (TG) mértünk automatizált enzimatis és kolorimétris eljárással (Roche Integra 800 System, La-Roche Ltd.), valamint stressz fehérjék vizsgálatát végeztük el (Human Cell Stress Array Kit, R&D Systems).

3.2 A petezsákok minőség értékelő rendszere

Egy általunk felépített értékelési rendszerben 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) és halott (mozdulatlan, szintelen) embriók 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.

3.3 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-géllal kiöntött Petri csészében 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).

3.4 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 specifitása miatt egy gyors és alkalmas eszköz a molekulák (metabolitok,

lipidek, peptidek) feltérképező jellegű, kvalitatív analízisére. A csigatojásból történt egy-sejt metabolomikai vizsgálatokhoz (embrió és szikanyag) kapilláris mikro-mintavételi technikát alkalmaztunk. 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, melyből egy mintavételi kapillárisal mikromanipulátor segítségével ~0.3 µL szikanyagot vettünk mind a kontroll, mind a 10 ng/L kezelt állatok tojásaiból (n=12 csoportonként). Az egy-sejtes állapotú zigóta ~100-120 µm átmérőjű, gömb alakú sejt, a peterakást követően már egy órán belül kettéosztódik. A citoplazma mintavétel során egy polírozott hegyű, ~20 µm végátmérőjű (~0.5-1 MΩ ellenállású) rögzítő kapillárist és egy röviden elvékonyodó (short tapering) ~1 µm végátmérőjű (2-3 MΩ ellenállású) mintavételi kapillárist 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 szikanyag és a citoplazma metabolit összetételét MS-el vizsgáltuk ion mobilitás analizátorral (IMS) is felszerelt repülési idő (TOF) analizátoros tömegspektrométerrel (Synapt G2-S, Waters Co., Milford, MA), valamint Off-line NanoElectrospray ionforással (73084, Bruker Daltonics, Bréma, Németország) felszerelt Bruker AmaZon SL (Bruker Daltonics, Bréma, Németország) ion csapda analizátoros tömegspektrométerrel szintén elvégeztük.

3.5 Statisztikai analízis

A statisztikai analízis OriginPro® 2015 (OriginLab Corp., Northampton, Massachusetts, USA) és IBM SPSS Statistics Version 20 (IBM Magyarország Kft.) szoftverekkel történt. 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, Scheffé 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 *L. stagnalis*-ban, a DJ-1 fehérje mennyiség, koleszterin, HDL-, LDL-koleszterin és triglicerid meghatározása *R. rutilus*-ban. 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.

4 Eredmények és következtetések

4.1 Vitellogenin és vitellogenin-szerű fehérjék vizsgálata

Kísérleteinkben a gerinctelen és a gerinces vízi állatok egyaránt érzékenyek bizonyultak a progesztogén szennyezésre. Megvizsgáltuk a VTG, a nőstényekben az ösztrogén szennyezés kimutatására általánosan alkalmazott biomarker használhatóságát progesztogén szennyezésben. Azt találtuk, hogy *L. stagnalis*-ban már az átlagos környezeti koncentráció is jelentős változást eredményezett a VTG-szerű fehérjék expressziójában, de *R. rutilus*-ban csak a legmagasabb kezelési koncentráció okozott változást a VTG szintben. A VTG szintézis a hexózok és az aminosavak elérhető mennyiségétől függ, összhangban azzal a ténnyel, hogy a reprodukció feltétele az általános tápláltsági állapotban bekövetkező pozitív változás. Magas VTG tartalom mérhető ivarérett nőstényekben, melynek szintje a vitellogenezis során emelkedik. A vitellogenezis folyamata gerincesekben 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, tuskés

bolharákban) a hemolimfában található VTG-szerű fehérjék forrásaként egyéb szerveket, pl. a középbél mirigyét (hepatopancreas) és a fehérjemirigyét (glandula albuginea) jelölték meg. A legtöbb tojásrakó fajban a VTG-szerű fehérjék és a VTG olyan proteinek prekursorai a petesejtben, melyek biztosítják az embriogenezishez szükséges energia tartalékot (vitellinek). *L. stagnalis*-ban ilyen ismert, vitellin típusú molekula a petesejt-ferritin (Giusti et al, 2013; Bottke et al, 1986), de egyéb tüdőcsigákban, pl. *Helix aspersa*-ban (Barre et al, 1991), *Helisoma duryi*-ben (Miksys et al, 1986), vagy *Planorbarius corneus*-ban (Dreon et al, 2002) is leírtak petesejt vitellineket. Eredményeink szerint a középbél mirigyben a VTG-szerű fehérje mennyisége szignifikánsan emelkedett a 21 napos kezelési periódus végére, összhangban a harmadik héten megfigyelt emelkedett petesejttermeléssel. Giusti (2013) szerint a petesejt-ferritin expressziója a 21 napos progesztogén típusú CPA kezelésben (2 – 50 µg/L) nem változott jelentősen *L. stagnalis*-ban. Ez az általunk megfigyeltékhez képest eltérő változás a vitellin típusú és a VTG-szerű fehérjék szintjén is bekövetkezhet, háttérben az alkalmazott, eltérő koncentrációk (10 ng/L vs. 2 – 50 µg/L), valamint az eltérő progesztogén hatóanyagok állhatnak. Egyéb progesztogének hatását a csigák VTG-szerű fehérjeire ez idáig nem vizsgálták.

Gerinces fajok esetében eltérő adatok található az irodalomban. DeQuattro (2012) csökkent VTG mRNS tartalmat mutatott ki tüzscellében 21 nap hosszú, 10 ng/L PRG kezelést követően. Zucchi (2014) 14 napos kezelés során azt figyelte 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 megfigyelte, hogy 500 ng/L DRO kezelés önmagában, és 40 ng/L PRG-nal kombinációban is jelentősen csökkentette a máj VTG mRNS szintjét. Ezzel szemben a plazma VTG szintje mindvégig változatlan volt az egyedüli DRO és a PRG-nal kombinációban történő kezelése során az említett koncentrációkban 14 napos kezelési periódusban. Más tanulmányok szerint 0,5 és 5 ng/L LNG kezelés nem volt hatással tüzscellében a plazma VTG tartalomra, 25 ng/L jelentősen növelte, 100 ng/L pedig jelentősen csökkentette azt. 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.

4.2 DJ-1 fehérje vizsgálata

Ezek miatt merült fel az igény egy új, progesztogén szennyezés jelzésére alkalmasabban használható biomarker felkutatására. 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 (NRF2, PSF, LDL-receptor).

A DJ-1 fehérje szerepét tekintve az oxidatív stressz elleni védelemben, a sejt túlélésben, a proliferációban és a gén transzkripcióban jelentős hatással bír. Tekintve, hogy a DJ-1 fehérje és a szteroid hormonok számos közös támadásponttal rendelkeznek, azt feltételeztük, hogy a DJ-1 fehérje szintje hormonkezelésben megemelkedik, de *L. stagnalis*-ban szignifikánsan csökkent a 7. napon. Ezáltal alkalmasnak bizonyult a szennyezés korai jelzésére, de krónikus kezelésben már nem tapasztaltunk jelentős eltérést a DJ-1 szintjében. Ez arra utalhat, hogy ebben a fajban nincs közös támadáspontjuk, a változás iránya pedig arra utal, hogy a csiga egyéb úton valószínűleg meg a stressz elleni védekezést, amelyre az energiáit fordítja, azonban a DJ-1 fehérje szintje hamar visszaáll a fiziológiás szintre.

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 emelkedett. Ezt immunhosztokémiai

vizsgálataink is alátámasztották. Összegezve, a DJ-1 alkalmasabb biomarker progesztogén szennyezés felmérésére, mint a VTG. Azonban, a DJ-1 használhatóságát, mint hatásos biomarkert vízi ökoszisztémák progesztogén szennyezésének kimutatásában, további kísérletekkel kell megerősíteni más fajokon is végzett vizsgálatok alapján.

4.3 Progesztogén kezelés hatására kialakuló változások felnőtt *L. stagnalis*-ban

L. stagnalis-ban 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 reprodukív rendszer szabályozásában. *L. stagnalis* CNS-ében feltérképeztük a GnRH-szerű peptid immunopozitív sejtek eloszlását, ez a neuropeptid felelős a nőstény és a hím reprodukív szabályozásáért egyaránt, de a pontos szerepe a csigákban még nem tisztázott. A CNS-ben megfigyeltünk kicsi (<50 µm), közepes (50 - 100 µm) és óriás (100 - 150 µm) méretű immunopozitív neuronokat, amelyek a bal/jobbs agydúcban (L/RCG), a bal/jobbs lábdúcban (L/RPeG), a jobb fali dúcban (RPG) és a zsigerdúcban (VG) helyezkedtek el. Ugyanezekben a ganglionokban a neuropil varikózus rostjai is mutattak immunreaktivitást. Nem-neuronális szövetekben (pl. kötőszövet, hártýaborítás, erek) nem azonosítottunk GnRH-szerű peptideket expresszáló sejteket. A korábban *Helisoma trivolvis*-ban és *Haliothis asinina*-ban leírtakhoz hasonlóan *L. stagnalis*-ban is a VG-ból az ivarszervi és bél idegen keresztül kifutó rostokat figyeltünk meg. Egy korábbi, *L. stagnalis*-on végzett tanulmányban leírtakkal összevetve hasonlóság volt abban, hogy a legintenzívebben jelölődő régió a L/RCG laterális lebenye, valamint hogy a L/RBG és LPG-ban nem láthatók GnRH-immunopozitív sejtek, illetve rostok. Ezzel szemben, eltérés mutatkozott a L/RPIG és L/RPeG jelölődésében, ugyanis a korábbi tanulmánnyal ellentétben, mi nem figyeltünk meg immunopozitivitást a L/RPIG-ban, azonban a L/RPeG-ban igen. A L/RPeG-ban mind az 5 immunopozitív sejtcsoport szimmetrikusan jelölődött a bal és a jobb oldalon. A RCG jelölődésének intenzitásában 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 reprodukív szabályozásában vesznek részt. A nőstény reprodukívhoz kapcsolható agyi területeken (RPG, L/RCG CDC sejtjei, a VG-ból kifutó ivarszervi és bél ideg) a GnRH immunopozitivitás nem változott progesztogén keverékkel történő kezelés hatására.

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. Az általunk is alkalmazott progesztogének hatására leírtak csökkent spermium motilitást tűzcselében (300 ng/L PRG kezelés, 1 hét), csökkent spermium számot tüskés pikóban (65 ng/L LNG kezelés, 45 nap), valamint megfigyelték, hogy LNG-rel (1, 10, 100 ng/mL) kezelt humán spermiumokban dózis-függő módon csökkent a mozgási képesség és a petesejttel való fúziós kapacitás. A petesejt szám, ami szignifikánsan csökkent az első héten, a harmadik hét végére a kétszeresére emelkedett a kontroll csoporthoz képest. Eredményeinkhez hasonlóan mások is ugyanezt figyelték meg a progeszteron receptor agonista vinclozolinval kezelt (25 ng/L, 21 nap) *L. stagnalis*-ban. A petesejt szám emelkedés hátterében álló okok felderítéseként további vizsgálat lehet a PR lokalizáció meghatározása a *L. stagnalis* CNS-ben, valamint a nőstény reprodukívhoz kapcsolható szervekben egyaránt.

4.4 Progesztogén-indukálta változások a kezelt *L. stagnalis* 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, a GPCR-AC-cAMP-PI3K-AKT útvonalon, a GPCR-JAK/STAT útvonalon illetve a GPCR-AC-cAMP-PKA-GLI3-Hedgehog útvonalon keresztül is. Az általunk részletezett végpontok (sejtosztódás, adenilát energiahordozók aránya - AEC, hexóz felhasználás és redox státusz) egyikét sem vizsgálták korábban szélesebb értelemben ED, szűkebb értelemben progesztogén kezelések során. 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 sejtes fázist, ugyanakkor a végső kikelés nem történt meg hamarabb a kontroll csoporthoz képest. A tojás képzés és annak összetétele a szülőktől függ és meghatározza az utód életképességét. A szikanyagból és az egysejtes zigótából összesen 31 metabolitot azonosítottunk, a kontroll és a kezelt tojások között kvalitatív különbséget nem találtunk. Azonban az egyes metabolitok arányát tekintve a kezelt szülők utódai a korai fejlődési stádiumban olyan, a kontroll csoporttól eltérő paraméterekkel rendelkeztek, amelyek a szénhidrát anyagcserét érintették. Az egy-sejtes 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 (glükóz, galaktóz, stb) felhasználásától függ, 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. A glikogén elraktározott energia forrásként szolgál a fejlődő embrió számára. 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, 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 felerősíti a hexóz felvételt, így a hexóz metabolizmus nem sérül. Wells (2003) szerint az UDP-hexNAc készlet direkten 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, ezért feltételezhető, hogy az embriók tápanyagellátása nem sérül a szülők hormonkezelése során. Érdeemes lenne vizsgálni a szülői progesztogén kezelés későbbi hatásait egy több-generációt érintő kísérletben a tolerancia/adaptáció megfigyelése érdekében.

4.5 Progesztogén kezelés-indukálta változások *R. Rutilus*-ban

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 (vese és máj hipertrófia, gonád hipotrófia) a progesztogén keverék koncentrációjától függetlenül szignifikánsan változtak a kontroll csoporthoz képest. Eredményeinkhez hasonlóan, egy korábbi tanulmány szintén vese hipertrófiát állapított meg ≥ 40 ng/L LNG kezelés hatására nőstény tuskés pikóban. Zucchi (2014) szignifikáns csökkenést látott a GSI értékben 5000 ng/L DRO és 400 ng/L PRG kettős kezelés hatására zebadánióban, de DeQuattro (2012) tüzcsejében 1000 ng/L PRG kezelésben

nem tapasztalt változást a GSI értékben. Az is ismeretes, hogy a GSI szezonálisan változik a Balatonban élő keszegfélékben: 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 jelentősen gátolta a gonádok lassú növekedését.

Molekuláris szinten az 500 ng/L koncentrációjú progesztogén keverékkel kezelt állatok szérum koleszterin és LDL-koleszterin értékei szignifikánsan csökkentek, 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.

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.

5 Új tudományos eredmények

1. 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.
2. Alternatívaként egy új, eddig progesztogén szennyezés jelzésére még nem alkalmazott molekulát, a DJ-1 fehérje lehetséges biomarker szerepét vizsgáltuk. *R. rutilus*-ban nemtől függetlenül a krónikus progesztogén szennyezés jelzésére alkalmas és pozitív prediktív értéke van már az általános környezeti koncentráció tartományban is. *L. stagnalis*-ban csak az akut progesztogén szennyezés kimutatására alkalmas.
3. A nagy mocsári csigában a hím és a nőtény 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.
4. Kidolgoztunk egy sikeresen alkalmazható petezsák értékelő rendszert, amely alapján összehasonlítható volt a kontroll és kezelt csoportok által rakott petezsákok minősége.
5. 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, a metabolikus arányokban szignifikáns eltéréseket tapasztaltunk és felgyorsult a sejtosztódás sebessége is. A progesztogén kezelt szülők több hexóz jelenlétét biztosították a szikanyagban.
6. Bodorkában azt találtuk, hogy egyes testtömeg indexek jelentős változást mutattak már az átlagos környezeti koncentrációjú progesztogén kezelésben is (MSI, VSI). Molekuláris szinten megfigyeltük a koleszterin és az LDL-koleszterin szintek csökkenését, valamint számos különböző biológiai funkciójú fehérje jelentős változását.

Publikációs lista

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)

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, **Zrínyi 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)

Az értekezés alapjául szolgáló tudományos közlemények magyar nyelven

Zrínyi 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.

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.

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 technológiai 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 technológiai 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 keszezen (*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.

Összefoglaló tudományometriai táblázat az MTMT adatbázis alapján

Közlemény típusok	Száma		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
Idézők disszertációban, egyéb típusban	0	---	1	1
Idézők összesen, minden típus, minden jelleg	---	---	39	47

Összesített impakt faktor: 33,97
Hivatkozások: 47 (39)
h-index: 5

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, **Dr. Pirger Zsolt** tudományos főmunkatársnak előremutató tanácsaiért és irányításáért, amellyel segítette eddigi munkámat. Köszönettel tartozom kollégáimnak, kiemelten **Dr. Maász Gábornak**, **Kiss Tibor** és **Elekes Károly** professzor uraknak minden segítségükért és az építő kritikákért, amellyel segítették munkámat, és akik soha nem mondtak nemet a segítségkérésre, továbbá az MTA Ökológiai Kutatóközpont **Balatoni Limnológiai Intézet dolgozóinak**, kiemelve a **NAP_B Adaptációs Neuroetológiai Kutatócsoport** munkatársait. Köszönetemet fejezem ki kollaborációs partnereinknek, **Vértes Ákos** professzor úrnak, a Vértes 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. 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.