

**KÖRNYEZETI ÖSZTROGÉNEK VIZSGÁLATA
KLINIKAI ÁLLAPOTOKBAN**

Doktori (Ph.D.) értekezés

Dr. Vigh Éva

Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Gyógyszertudományok Doktori Iskola

Doktori Iskola vezetője: Dr. Barthó Lóránd

Programvezető: Dr. Pintér Erika

Témavezető: Dr. Garai János

Pécs

2012

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	4
1.1. Endokrin diszrupció definíciója	4
1.2. Környezeti ösztrogének: fitoösztrogének és xenoösztrogének	4
1.3. Fitoösztrogének	6
1.3.1. Fitoösztrogénekről általában	6
1.3.2. Fitoösztrogének csoportosítása	6
1.3.3. Fitoösztrogének hatásmechanizmusa	7
1.3.4. Kávésav	9
1.4. Xenoösztrogének	11
1.4.1. Xenoösztrogénekről általában	11
1.4.2. Xenoösztrogének csoportosítása	11
1.4.3. Xenoösztrogének hatásmechanizmusa	12
1.4.4. Perzisztens organikus pollutánsok (POP)	13
1.5. Makrofág migráció inhibitor faktor (MIF)	16
1.5.1. Történeti áttekintés	16
1.5.2. A MIF szerkezete	16
1.5.3. A MIF hatásmechanizmusa	17
1.5.4. A MIF szerepe egyes kórállapotokban	19
1.5.5. A MIF enzimaktivitása	20
2. Cikóriakávé fogyasztás egyes klinikai hatásainak vizsgálata	22
2.1. Bevezetés és célkitűzés	22
2.2. Módszerek	23
2.3. Eredmények	25
2.4. Eredmények megbeszélése és következtetés	28
3. PCB és PCDD/F vegyületek jelenlétének vizsgálata magyar anyatejmintákban	30
3.1. Bevezetés és célkitűzés	30
3.2. Módszerek	30
3.3. Eredmények	34
3.4. Eredmények megbeszélése és következtetés	40

4. MIF jelenlétének vizsgálata anyatejmintákban.....	44
4.1. Bevezetés és célkitűzés	44
4.2. Módszerek	45
4.3. Eredmények.....	46
4.4. Eredmények megbeszélése és következtetés.....	48
5. Új eredmények összefoglalása.....	49
6. Köszönetnyilvánítás.....	51
7. Rövidítések jegyzéke	52
8. Függelékek.....	54
9. Irodalomjegyzék	56
10. Publikációs jegyzék	78

1. Bevezetés

1.1. Endokrin diszrupció definíciója

Az endokrin diszrupció első tudományosan dokumentált esetét Ausztráliában írták le, amikor juhok infertilitását figyelték meg miután legeléskor olyan növényi hatóanyagokat fogyasztottak, melyekről később bebizonyosodott, hogy interferálhatnak az ovariális ösztrogénekkal. [1] A jelenségért az ún. szubterrán hereféleség (*Trifolium subterraneum*) Dwalganup fajtája volt felelős, ezért a here angol neve után ezt az infertilitást „clover betegségnek” nevezték el. Az endokrin diszruptor vegyületeknek (endocrine disruptor chemical, EDC) számos definíciója létezik. A Nemzetközi Kémiai Biztonsági Program (International Programme on Chemical Safety, IPCS) megfogalmazása szerint „endokrin diszruptor vegyület olyan exogén anyag vagy azok egy csoportja, mely megváltoztatja az endokrin rendszer működését és ennél fogva káros egészségügyi következményt hoz létre egy egészséges szervezetben vagy annak utódaiban vagy egy (szub)populációban”. [2] Az Amerikai Környezetvédelmi Ügynökség (United States Environmental Protection Agency, US EPA) definíciója szerint viszont az EDC „olyan exogén anyag, mely interferál a természetes, vér által szállított hormonok szintézisével, szekréciójával, transzportjával, metabolizmusával, kötődésével vagy eliminációjával, melyek a szervezetben megtalálhatók és felelősek a homeosztázisért, a szaporodásért és a fejlődésért”. [3] Míg az előbbi megközelítés nyilvánvalóan átfogóbb, addig az utóbbi sokkal informatívabb az egyes érintett mechanizmusok tekintetében.

1.2. Környezeti ösztrogének: fitoösztrogének és xenoösztrogének

A „környezeti ösztrogén” kifejezés használata kiterjed mind a növényi eredetű ösztrogénekre (ún. fitoösztrogének), mind az antropogén ösztrogénekre (ún. xenoösztrogének). Míg a környezeti ösztrogén kifejezés bizonyára megfelelő bioökológiai szempontból, azonban túl tág és közegészségtani nézőpontból nem praktikus. Habár mindkét csoport képviselői valóban megtalálhatók a környezetben, éles különbséget kell tenni köztük az emberekre és a vadvilágra esetlegesen gyakorolt kockázatuk értékelésekor. A xenoösztrogénnel ellentétben, melyek az emberi

tevékenység következményeként jórészt a legújabb korban kerültek be a környezetbe, a fitoösztrogének az állatfajok evolúciójának során – beleértve sajátunkat is – mindvégig jelen voltak a Föld bioszférájában, következésképpen természetes környezetünk szerves részének kell tekintenünk őket. Azonban antropocentrikus szempontból a természetesen előállított anyagok nem feltétlenül ártalmatlanok vagy hasznosak. Például néhány állatfaj (beleértve a juhokat és a szarvasmarhákat [4], a sertéseket [5], a nyulakat [6], stb.) termékenységét kedvezőtlenül befolyásolták a takarmánnyal nagy mennyiségben fogyasztott ösztrogén vegyületek.

1.3. Fitoösztrogének

1.3.1. Fitoösztrogénekről általában

A növényi eredetű vegyületek, melyek képesek az ösztrogén receptorokhoz kötődni és ösztrogénszerű vagy ösztrogén ellenes hatásokat kifejteni. Az evolúció során az emberi fitoösztrogén expozíció folyamatos volt az ősember főleg növényeken alapuló táplálkozásán keresztül, és még napjainkban is az a hüvelyesek, magvak, teljes kiőrlésű kenyér fogyasztásával. Kifejezetten igaz ez a tradicionális kelet-ázsiai konyhaművészetre. A xenoösztrogénekkal ellentétben a fitoösztrogének nem bioakkumulálódnak, azaz nem raktározódnak a szervezetben, mivel relatíve gyorsan metabolizálódnak és/vagy kiválasztódnak. [7, 8] Jóllehet, jelentős interindividuális különbségek figyelhetők meg az eliminációjukban. [9]

Felvetették, hogy a fitoösztrogének talán a növényevők termékenységének modulatoraiként alakultak ki, hogy csökkentsék az elfogyasztott növények mennyiségét. [10] Sokkal valószínűbb azonban, hogy némely lignán és izoflavonoid valójában a növényt megtámadó organizmusok elleni védekezésül termelődik, ezek a fitoalexinok (antimikrobiális védelem hatóanyagai, melyek a mikrobás behatásra szintetizálódnak). [11, 12] A flavonoidoknak szerepük van a hüvelyes növények gyökergümőiben megtelepedő nitrogényűjtő szimbiotikus baktériumokkal történő kémiai kommunikációban is. [13, 14]

1.3.2. Fitoösztrogének csoportosítása

A ma ismert fitoösztrogének túlnyomó többsége a növényi fenolok nagy csoportjába tartozik. Habár szteroid ösztrogéneket (ösztradiol vagy ösztron) izoláltak bizonyos növényekből, tényleges koncentrációjuk nem ismert, de azt meglehetősen alacsonynak becsülik. [15] További kategorizálásuk alapján vannak köztük kromén származékok, flavonoidok, izoflavonoidok, izokumarinok, kalkonok, kumesztánok, stilbének, lignánok, ginzenozidok, tetrahidrofurandiolk, fahéjsav származékok, 2-arilbenzofuránok és számos egyéb fenolos vegyület.

Az emberek által jelentős mennyiségben fogyasztott fitoösztrogének többsége az izoflavonoidok és a lignánok csoportjába tartozik. [16, 17] Míg az izoflavonoidok

jórészt bizonyos hüvelyesekben található, messze leggazdagabb forrásuk a szója (*Glycine max*) [18], addig a lignánok majdnem minden növényben megtalálhatók, de a lenmagban van a legtöbb (*Linus usatissimus*). Sokkal kisebb, de jelentős mennyiségben megtalálhatók még a napraforgóban, mogyoróban, szezámagban, tökben [19], valamint a tea és a kávé is tartalmaz lignánokat [20].

1.3.3. Fitoösztrogének hatásmechanizmusa

A fitoösztrogének jellemzése és osztályozása nagyban függ az ösztrogenitás adekvát definíciójától, mely a mai napig vitatott kérdés. [21, 22] 1995 előtt egy vegyület ösztrogenitását uterotrófiás aktivitása alapján határozták meg, azaz, hogy mennyire képes serkenteni a méh növekedését és mennyire képes indukálni a méh progeszteron receptor expresszióját. Az ösztrogének hatásmechanizmusáról való jelenlegi tudásunk alapján egy vegyület ösztrogén hatásának tekintendő, ha: (1) mégha elég alacsony affinitással is, de képes az ösztrogén receptorokhoz (ER) kötődni, és (2) biológiai hatás(oka)t vált ki ösztrogénre-érzékeny szövetekben és/vagy sejtekben, melyek legalább részben hasonlóak a 'valódi' petefészek eredetű ösztrogén hormonok által indukált válaszokhoz. Ezen biológiai válaszok magukban foglalják az ösztrogén-érzékeny gének expresszióját. Azonban a fitoösztrogének nem feltétlenül aktiválják a petefészek ösztrogének által szabályozott gének teljes spektrumát, valamint hatásfokuk többnyire kisebb. [23] Másrészt egy környezeti ösztrogén olyan hatásokat is kiválthat, melyeket a szteroid ösztrogének nem. [23, 24] Míg egy gyenge ösztrogenitású vegyület egymagában hatva agonista hatásokat fejthet ki, addig antagonizálhatja egy erősebb agonista (pl. 17 β -ösztradiol) hatását. Ebben a tekintetben a legtöbb fitoösztrogént kevert ösztrogén agonistának-antagonistának kell tekintenünk. [25, 26] A kissé ormótlan, de helyes kifejezés, szelektív ösztrogén receptor modulátor (SERM) arra utal, hogy bizonyos ösztrogénszerű vegyületek inkább jellegzetes agonista-antagonista hatásspektrumot váltanak ki a különböző szövetekben, azaz némely szövetben főként agonistaként, míg máshol főként antagonistaként viselkednek, vagy esetleg néhol egyáltalán nem viselkednek ösztrogén analóggént. [27] Ugyanezen fogalom néhány fitoösztrogénre is igaz lehet. [28] A „klasszikus” ER izoformát 1986-ban klónozták [29, 30], az ezt követő évtizedben úgy tűnt, hogy a szteroid ösztrogének egyetlen ER-on keresztül fejtik ki hormonális hatásukat. Azonban 1996-ban Gustafsson és mtsai. [31] sikeresen klónozták az ER egy második izoformáját. Ennélfogva a régebben ismert

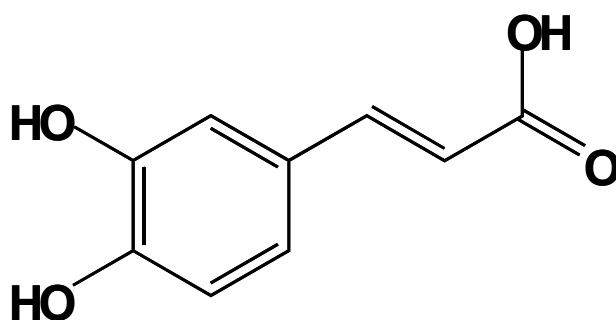
ösztrogén receptor alfa ($ER\alpha$), míg az újonnan talált ösztrogén receptor béta ($ER\beta$) néven szerepel manapság a szakirodalomban. Az $ER\alpha$ vagy $ER\beta$ konformációs változása, melyet egy ösztrogén hatású ligand kötődése vált ki, meghatározhatja egy vegyület agonista vagy antagonistá hatását. [32]

Az elmúlt évtizedek kutatásai alapján úgy tűnik, hogy ezen anyagok növényi táplálékon keresztüli folyamatos, mérsékelt expozíciója valójában inkább előnyös az emberi szervezetnek, mivel a fitoösztrogének megelőzhetik a rosszindulatú daganatok kialakulását [33, 34], és javíthatják a szív- és érrendszeri egészségi állapotot [35]. Ismert, hogy ezen hatásokat legalábbis nagy részben nukleáris receptorok közvetítik, úgymint az $ER\alpha$ és β valamint az aril-hidrokarbon receptor (AhR). [36, 37] Úgy tűnik, hogy néhány hatást viszont a membrán (ösztrogén-) receptorok és/vagy a protein kinázok/foszfátázok közvetítenek az intracelluláris szignál mechanizmusokon keresztül. [38–40] Némelyik fitoösztrogén interferál az ösztrogének szintézisével és metabolizmusával. [41, 42] Úgy tűnik, hogy az antioxidáns aktivitás is hozzájárul a fitoösztrogének kedvező hatásaihoz. [43, 44] Ismert, hogy a szteroid ösztrogén származékoknak is van antioxidáns hatásuk. [45, 46]

A dietetikusok a fitoösztrogénekben gazdag ételek fogyasztását általában azok általános étrendi előnyeik és nem csupán fitoösztrogén tartalmuk miatt ajánlják. Számos egészséges, nem ösztrogénhatású komponens tartalmaznak a fitoösztrogének mellett. Például a lenmag tartalmaz linolénsavat (esszenciális zsírsav), rostokat és E-vitamint; a szója tartalmaz lecitint, fehérjét, rostot és E-vitamint; a bogyós termések és a tea anitoxidáns antociánokat és epikatehin-gallátokat tartalmaznak. A fitoösztrogének jótékony hatásokat ösztrogenitástól függetlenül is kifejthetnek, mivel antioxidáns, antiproliferatív és anti-angiogén tulajdonsággal rendelkeznek, melyek mind hozzájárulhatnak rákellenes, csontritkulás ellenes valamint a szív- és érrendszerre kifejtett kedvező hatásaikhoz. [47–49] A teljes kiőrlésű gabonamagvakban, zöldségekben és gyümölcsökben gazdag étrendek különféle kémiai szerkezetű, változó $ER\alpha$ és $ER\beta$ szelektivitású fitoösztrogéneket tartalmaznak. Jól ismert, hogy ezen étrendek mellett a rosszindulatú daganatok, egyes gyulladásos betegségek, a cukorbetegség, és a szív- és érrendszeri betegségek kialakulásának alacsonyabb a kockázata. [50]

1.3.4. Kávésav

A kávéssav, $C_9H_8O_4$, az egyik leggyakoribb növényi fenol vegyület. Számos forrása ismert, mint például a cikóriakávé (*Cichorium Intybus*), az articsóka (*Cynara scolymus*), az olívaolaj (*Oleum europeum*), a vörösbors, az ördögkarom (*Harpagophytum procumbens*), az ajakos virágúak családjába (*Lamiaceae*) és a keskenylevelű kasvirág (*Echinacea angustifolia*).



1. ábra. A kávéssav szerkezeti képlete.

A kávéssavnak illetve származékainak nincs közvetlen fitoösztrogén hatásuk: nem képesek az endogén $ER\alpha$ -t expresszáló MCF-7 sejtek ösztrogén receptorához kötődni, azaz *in vitro* nem rendelkeznek szignifikáns ösztrogén aktivitással. [51] Egyes eredmények azonban azt mutatják, hogy más mechanizmussal befolyásolhatja a szérumban az ösztrogén szintet. A kémiaiilag reaktív katecholösztrogén vegyületek gyors inaktivációjának, detoxifikációjának egyik módja az O-metiláció. A katecholösztrogének, mint például a 2-hidroxiösztrodiol és a 4-hidroxiösztrodiol O-metilációját a katechol-O-metiltransferáz (COMT) katalizálja. [52] Kutatások szerint a 2-metoxiösztrodiol (a 2-hidroxiösztrodiol O-metilációjának fő terméke) erős apoptotikus, anti-angiogenikus és rákellenes hatással rendelkezik. [52, 53] A humán COMT alacsony szubsztrátspecifitása miatt számos katechol-tartalmú endobiotikum illetve xenobiotikum O-metilációját katalizálhatja, ezért a katecholösztrogének *in vivo* O-metilációjának mértékét befolyásolhatják a szervezetben jelentős mennyiségben jelenlévő egyéb katechol tartalmú vegyületek. Egyes polifenol vegyületek, mint a quercetin és az (-)-epigalloketchin-3-O-gallát hatékonyan gátolják a katecholösztrogének O-metilációját [54, 55], és ezáltal elősegítik az ösztrogén

indukálta tumorgenezist. [56] A kávésav és annak kinasavval észterifikált származéka a klorogénsav is koncentrációfüggően, kevert (kompetitív és nonkompetitív) mechanizmussal gátolja a 2- és a 4-hidroxiösztradiolok O-metilációját. [57] Számítógépes molekuláris modellszámítások szerint ezen polifenolok – hasonlóan a katecholösztrogénekhez – a COMT aktív helyéhez tudnak kötődni, azonban a kötődés affinitása magasabb [57], ezáltal emelhetik a szérum ösztadiol szintet [58].

A kávésav antioxidáns hatásának köszönhetően is gyulladásgátló tulajdonsággal rendelkezik. [59, 60] Antioxidáns hatását próbálják meg kihasználni a tumorok kialakulásának megelőzésében, illetve a tumorok növekedésének gátlásában. [61]

A kávésavról és származékairól leírták, hogy in vitro és in vivo körülmények között gátolják a trombocita aggregációt. [62, 63] A gátlás feltételezett mechanizmusa a tromboxán B2 és a leukotrién B4 szintézisének a gátlása.

A kávésav gátolja egy gyulladáskeltő immunmediátor, a makrofág migráció inhibitor faktor (MIF) tautomeráz enzimaktivitását. A kávésav nem csak a citokin dopakróm tautomeráz aktivitását gátolja [64], hanem számos gyulladásgátló fitokemikália közül a kávésav bizonyult az egyik legjobb gátló molekulának a fenilpiruvát tautomeráz aktivitást illetően is. [65] A kávésav koncentrációfüggő módon gátolja a fenilpiruvát tautomeráz reakciót, a ketonáz reakció IC_{50} értéke $0,5 \mu M$, az enoláz reakció IC_{50} értéke $2 \mu M$ volt. [65]

1.4. Xenoösztrogének

1.4.1. Xenoösztrogénekről általában

A II. világháború utáni ipari fejlődés számos új szintetikus vegyület előállítását hozta magával, melyek közül több vegyület széles körben elterjedt környezeti szennyezőanyaggá vált. [66] Ide sorolhatók a peszticidek, a műanyag-lágyító szerek, a tisztítószeres, a festékek, a kozmetikumok, stb. A különféle környezeti szennyezőanyagok befolyással lehetnek az endokrin funkciókra. Az endokrin diszrupcióval kapcsolatos aggodalmat fokozta a felismerés, hogy a korábban gyógyszerként használt dietilstilbösztrol [67], valamint az állattenyésztésben jelenleg használt más hormonok [68] alkalmazásának káros következményei is lehetnek. A xenoösztrogéneket a vegyipar állítja elő, a környezetszennyezés révén jutnak táplálékunkba, és ösztrogénszerű hatással rendelkeznek, innen kapták nevüket.

1.4.2. Xenoösztrogének csoportosítása

A környezeti xenoösztrogének legfontosabb csoportjait kémiai szerkezetük illetve felhasználásuk figyelembe vételével állíthatjuk fel. Alkalmazásukat tekintve lehetnek elektronikában használatos vegyületek, mint a poliklórozott bifenilek (PCB) [69], organoklorin növényvédőszeres, mint például a diklór-difenil-triklóretán (DDT) vagy a hexaklór-ciklohexán (HCH) [70], egyes műanyag-lágyítók, mint például a difenilalkánok csoportjába tartozó biszfenol A [71], egyes felületaktív anyagok és degradációs termékeik, mint például az alkilfenolok [72], valamint a kozmetikumok gyártása, a gyógyszer illetve élelmiszeriparban használt tartósítószeres, mint például a parabének [73].

Szerkezetileg különböznek a fitoösztrogénektől, azonban kémiai szerkezetükben nagy heterogenitást mutatnak. Sok közülük organoklorin vegyület, melyek a levegő porszemcséihez kapcsolódva messzire eljutnak, így jelen vannak az ipari tevékenységgel nem szennyezett területeken is. Ubiquiter (mindenütt jelenlevő) vegyületek, kimutathatók a levegőben, talajban, vízben. Rendkívül ellenállnak a kémiai és a biológiai degradációnak – felezési idejük akár több évtized is lehet –, az állatok és az emberek nem képesek lebontani/detoxikálni és/vagy kiválasztani ezen anyagokat,

ennélfogva igen hosszú ideig jelen vannak a környezetben és felhalmozódnak a táplálékláncban. [74] Nagy zsírolékonyságuk okán, elsősorban a nagy zsírtartalmú szövetekben halmozódnak fel. [75] Ezért a perzisztens organikus pollutáns (persistent organic pollutant, POP) gyűjtőnévvel illetett vegyületek csoportjába sorolhatók.

1.4.3. Xenoösztrogének hatásmechanizmusa

A xenoösztrogének hatásmechanizmusa lehet direkt hormon agonizmus vagy antagonizmus, endogén hormonszintek megváltoztatása illetve hormon receptorok módosítása. [76] Az endokrin diszruptor vegyületeként viselkedő xenoösztrogének többsége az élő szervezetekben az ösztrogénhez hasonló hatást fejt ki. [77] Mivel a xenoösztrogének a környezetben nem önállóan, hanem egymás mellett, mintegy keverékként vannak jelen, ezért általában több vegyület együttes expozíciójáról beszélhetünk. Alacsony xenoösztrogén szint is okozhat ösztrogénszerű aktivitást és befolyásolhatja az endokrin rendszert (ún. alacsony dózis hatás), a megfigyelt dózis-hatás görbe nem monotonias. [78] Az emberi szövetekben való biomonitorozásukkal lehetséges az egyes betegségek – mint például a rák vagy az urogenitális fejlődési rendellenességek – kialakulására kifejtett hatásaik felmérése. [79] Megemlítendő, hogy a xenoösztrogének képesek interferálni azon fitoösztrogénekkel is, melyek szabályozzák a hüvelyes növények és azok gyökérgümőiben a növényvel szimbiózisban élő nitrogéngyűjtő Rhizobium baktériumok közti jelátvitelt. [80]

A xenoösztrogén organoklorin vegyületek egyik nagy csoportját képezik a poliklórozott dibenzo-p-dioxinok (PCDD), mely vegyületcsoport legtoxikusabb tagja a 2,3,7,8-tetraklorodibenzo-p-dioxin (TCDD). A TCDD az *Agent Orange* nevű lombtalanítószer egy szennyezőanyaga, valamint a 2,4,5-triklórfenol gyártás egy mellékterméke. A TCDD az aril-hidrokarbon receptoron (AhR) keresztül fejt ki hatását. A ligand-kötött AhR és dimerizációs partnere, az AhR nukleáris transzlokátor (ARNT), transzkripció faktoroként befolyásolják a gének transzkripcióját. [81] A célgének közé a citokróm P450, a sejtek növekedésében és differenciációjában, valamint a gyulladásban szerepet játszó gének tartoznak. [82] Egy gátló AhR-ER kapcsolatot mutattak ki rágszálók emlőmirigyében és uterusában, valamint humán emlőrák sejtvonalakban. [83, 84] Az etinilösztradiollal és TCDD-vel kezelt egerekben az etinilösztradiol által indukált 2753 génből csak 133 expressziója változott TCDD együttes adásakor, ami gén-specifikus gátló hatásra utal. Ezen gátló hatás korrelált a megfigyelt szövettani változásokkal,

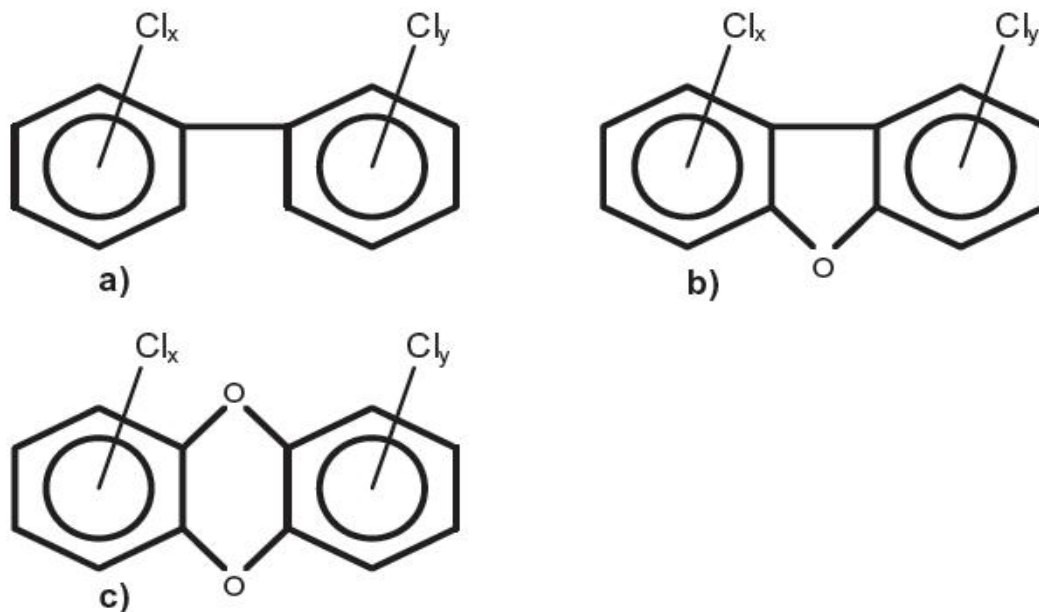
ezáltal hozzájárulhat a TCDD anti-uterotrofiás hatásához. [85] Rüegg és mtsai. [86] H-ERE sejteken (ösztrogénválasz-elem riporter gént tartalmazó HC11 sejtvonal, a HC11 egy ER α -t és ER β -t expresszáló egér emlő epitél sejtvonal) kimutatták, hogy dioxin kezelést követően az ARNT nagyobb mértékben kapcsolódik az AhR-hoz, mint az ER-okhoz, mely magyarázhatja a dioxinok antiösztrogén hatását. A dioxinok gátló effektusa sokkal kifejezettebb volt az ER β -, mint az ER α -mediált hatások esetén. Egér endometriózis modellben TCDD hatására egy sejttípus-specifikus interakciót figyeltek meg az AhR és az ER között. [87] 17 β -ösztradiol TCDD-vel együtt alkalmazva elősegítheti az endometriózis fellépését és hozzájárulhat kifejlődéshez, mivel fokozza az endometriális stromasejtek invázióját. [88]

1.4.4. Perzisztens organikus pollutánsok (POP)

A POP vegyületek közös, összefoglaló tulajdonsága, hogy ubiquiter szennyezők, stabilak, erősen lipofilek, feldúsulnak a táplálékláncban, a nagy zsírtartalmú szövetekben raktározódnak, átjutnak a placentán, kiválasztódnak az anyatejjel és széles toxikológiai spektrummal rendelkeznek. [89]

A POP-ok legtöbbször szerkezetét tekintve polihalogénezett aromás szénhidrogén, ezen belül is három fő csoportjukat különböztetjük meg. Mindhárom csoport tagjai két aromás gyűrűt tartalmaznak, csupán azok összekapcsolódása eltérő. Az egyes vegyületek változó számú és különböző helyzetű klór illetve bróm szubsztituenssel rendelkeznek. A legtöbbet kutatott vegyületek a klórral szubsztituált származékok, melyek szerkezetük alapján lehetnek poliklórozott bifenilek (PCB), poliklórozott dibenzo-p-dioxinok (PCDD) és poliklórozott dibenzofuránok (PCDF). Kongenereknek nevezzük azon vegyületeket, melyek felépítésüket és alkotóelemeiket tekintve egy csoportba tartoznak. (2. ábra)

A PCB-ket ipari felhasználás céljából állították elő. Széleskörben elterjedtek, mint kondenzátorok és transzformátorok dielektromos folyadécai, hűtő- illetve hidraulikus folyadékok, festékek lágyítószerai illetve vezetékek és kábelek szigetelőanyagai. [90] A PCDD/F-ket nem állítják elő ipari méretekben vagy szándékosan. Különböző vegyi folyamatokban nem kívánt melléktermékként keletkeznek. Ilyen azonosított források pl. a hulladékégetés, a vas és acélgyártás, a klórtartalmú szerves vegyületek előállítására és a papírfehérítés. [90, 91]



2. ábra. Egyes perzisztens organikus pollutáns (POP) vegyületek szerkezeti képlete:

A. poliklórozott bifenilek (PCB), **B.** poliklórozott dibenzofuránok (PCDF),
C. poliklórozott dibenzo-p-dioxinok (PCDD). A PCB és PCDD kongenerek kettős szimmetriával rendelkeznek, így 209 különböző PCB és 75 eltérő szerkezetű PCDD molekulát különböztethetünk meg. A PCDF molekulák már nem kettős szimmetriájúak, így nagyobb a szerkezeti összetételben lévő variációs lehetőségek száma, következésképpen 135 eltérő PCDF kongenerről beszélhetünk.

Ezen vegyületek ismert EDC-k, ezért az utóbbi évtizedekben számos tanulmány foglalkozott biológiai hatásaikkal. Szerepük lehet a magzatok és újszülöttek növekedési visszamaradásában [92], az újszülöttek és a gyerekek károsodott pszichomotoros [93], neuropszichológiai [94] és neurokognitív [95] fejlődésében. Továbbá befolyásolhatják a reprodukatív szervek [96, 97], a pajzsmirigy [98–100] és az immunrendszer [101] működését. Valamint szerepük lehet egyes ráktípusok kialakulásában [102, 103], ezért a Nemzetközi Rákkutató Központ (International Agency for Research on Cancer, IARC) a PCB-eket emberben valószínűleg rákkeltőként (IARC 2A) [104], míg a TCDD-t emberben bizonyítottan rákkeltőként (IARC 1) [105] sorolta be.

A hasonló *in vivo* és *in vitro* hatásuk alapján az egyes organoklorin kongenerek toxicitásának mértékét a vegyületcsoport legtoxikusabb tagjához, a TCDD-hez viszonyítva adják meg. Az ún. toxicitási egyenérték faktorok (TEF) [106] segítségével a

kérdésszerű komponensek abszolút mennyiségeit átszámíthatjuk TCDD koncentrációra. Egy kongener abszolút koncentrációjának és TEF értékének szorzata adja az ún. toxikus egyenértéket (TEQ). Egy minta össz-TEQ-je megfelel azon TCDD mennyiségnek, melynek toxicitása egyenlő a mintáéval, feltételezve, hogy az egyes kongenerek toxikus hatásai additívak.

A humán dioxin expozíció több mint 90%-ban az élelmiszerekből – ezen belül is a nagy zsírtartalmú, állati eredetű táplálékból – származik, az egyéb források, mint például a levegő vagy víz általi expozíció elhanyagolható mértékű. [107] A Közös FAO/WHO Élelmiszer Adalékanyag Szakértői Bizottság (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, JECFA) és az Európai Unió Élelmiszerügyi Tudományos Bizottsága (Scientific Committee on Food, SCF) az ezredfordulón felülvizsgálta az élelmiszerek dioxin tartalmának kockázatbecslésével kapcsolatos véleményét a TCDD-vel végzett állatkísérletekben a fejlődés során észlelt károsodások miatt. A szervezetek által megállapított 2 pg/ttkg tolerálható napi bevitelt (tolerable daily intake, TDI) TEQ-ben adták meg a TEF séma figyelembevételével. [108, 109]

Ahogy a POP-ok potenciális kockázatáról egyre több információ látott napvilágot, úgy az 1970-es évektől kezdődően számos ország tilalmat vezetett be egyes organoklorid vegyületek előállításával és használatával kapcsolatban. Ennek eredményeképpen az Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization, WHO) által végzett PCDD/F és PCB tanulmányok kimutatták, hogy a legtöbb országban ezen vegyületek anyatejbeli koncentrációja csökkenni kezdett. [110–112] A koncentrációk évenkénti csökkenését kb. 5%-nak vagy magasabbnak találták, mely a magasabb induló értékekkel rendelkező országokban kifejezettebb volt. [112] Annak ellenére, hogy ezen vegyületek többségét ma már nem gyártják, mégis jelen vannak illetve még hosszú ideig jelen lesznek a környezetben és az emberi szervezetben, mint az ipari folyamatok akaratlan melléktermékei. Következésképpen továbbra is fontos ezen perzisztens és toxikus környezeti szennyezőanyagok jelenlétének biomonitorozása a humán szövetekben, mint például az anyatejben, mely megbízható képet nyújt a humán expozíció mértékéről.

1.5. Makrofág migráció inhibitor faktor (MIF)

1.5.1. Történeti áttekintés

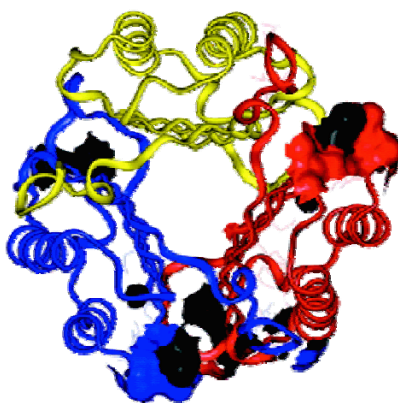
A MIF az egyik legrégebben ismert immunmediátor. Mint szolubilis faktort 1966-ban fedezték fel [113, 114], elsőként a későbbiekben citokinként számon tartott immunmediátorok közül. Kezdetben a T-limfociták kizárólagos termékének tekintették, melynek hatására a makrofágok random migrációja gátlódik in vitro. [114, 115] Ezt a faktort makrofág migrációs inhibitor faktornak, röviden MIF-nek nevezték el. Később számos nem immun sejtet azonosítottak, amelyekben megtalálható a MIF, ilyenek pl. az endokrin rendszer és az idegrendszer egyes sejtjei is. [116–119]

1989-ben a humán MIF gén első, sikeres klónozásával lehetőség nyílt a MIF szerkezetének megismerésére. [120] Ezt követően 1993-ban rekombináns technikával sikerült előállítani a MIF fehérjét is, mely mérföldkő volt a MIF kutatásában. [121] A neutralizáló monoklonális antitestek előállításával lehetőség nyílt a MIF expressziójának és a gyulladás kifejlődésében betöltött szerepének megismerésére. [122] A kezdeti tanulmányok a fehérjét az endotoxikus shock fontos mediátorának mutatták. [121] Így a MIF a gyulladásos kaskád kutatásának középpontjába került. Jelenleg a MIF-nek már számos funkciójáról vannak ismereteink, melyek túlmutatnak a makrofágok migrációját gátló hatásán. Ennek ellenére a név változatlan formában fennmaradt.

1.5.2. A MIF szerkezete

A humán MIF monomer egy 114 aminosavból álló fehérje, amelynek molekula tömege 12.5 kD. Háromdimenziós szerkezete röntgen-krisztallográfias analízissel három, azonos alegységből felépülő, homotrimer molekulát mutat. [123, 124] (3. ábra)

A MIF aminosav-sorrendje különböző fajokban nagyfokú homológiát mutat. Az emlősök között a homológia kb. 90% körüli. [125] De az emlősökön túl madarak, halak, rovarok, férgek és néhány növény (*Arabidopsis thaliana*) esetében is jelentős az egyezés. [126–129] A MIF univerzális előfordulása legkülönfélébb fajokban azt sugallja, hogy ez a fehérje fontos biológiai funkcióval rendelkezhet.



3. ábra. A MIF homotrimer szerkezete. Feketével jelölve a szubsztrátkötő helyek.

(Forrás: Lolis E. Curr Opin Pharmacol 2001, 1:662-668.)

1.5.3. A MIF hatásmechanizmusa

A rekombináns technikával előállított MIF fehérjével és neutralizáló anti-MIF antitesttel végzett kísérletek feltárták a MIF szerepét a gyulladás folyamatában. A MIF-fel kezelt makrofágok a gyulladás helyén maradnak, fokozódik fagocitotikus képességük, és hatékonyabban pusztítják az intracelluláris patogéneket mint pl. a *Leishmania major*-t. [130, 131] A MIF elősegíti a gyulladáskeltő citokinek expresszióját (TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IFN- γ) [132], a nitrogén monoxid felszabadulását [122], a mátrix metalloproteinázok expresszióját [133, 134], a ciklo-oxigenáz-2 (COX-2) aktivitását és a prosztaglandin E₂ (PGE₂) termelődését [135].

A MIF a CD74 immunrekogníciós membránfehérje extracelluláris alegységéhez kötődik, ami a sejtfelszíni formája a II. osztályú fő hisztokompatibilitási komplex (MHC) konstans láncának. [136] A citokin ezáltal extracelluláris szignál-szabályozott kinázokat (ERK1/ERK2) aktivál, amelyek a mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) család tagjai. [137] A CD74 molekulára szükség van az ERK1/ERK2 aktivációhoz, a sejtproliferációhoz és a PGE₂ szintézishez. A MIF hozzáadása után 30 perccel kezdődik az ERK foszforiláció, és 24 órán át marad fenn. Az ERK foszforiláció protein kináz A (PKA) aktivációhoz vezet, aminek következtében a foszfolipáz A₂ (PLA₂) működés fokozódik. A PLA₂ fontos komponense a gyulladásos mediátorok kaszkádjának, működésének elsődleges eredménye az arachidonsav produkció, melyből a későbbiekben prosztaglandinok és leukotriének képződnek. [138]

A Gram-negatív baktériumok endotoxinja (lipopoliszacharid, LPS) a Toll-like receptor

4-en (TLR-4) keresztül aktiválja a makrofágokat. A MIF hatására fokozódik a TLR-4 expressziója. [139] Ez a megfigyelés azt sugallja, hogy a MIF-nek jelentős szerepe van a veleszületett immunrendszer Gram-negatív endotoxinra való korai reagálásában. Ez is hozzájárulhatott ahhoz, hogy a MIF-knockout génmanipulált egerek rezisztensnek bizonyultak a halálos dózisú LPS-sel szemben. [140]

A MIF képes gátolni a p53 fehérje mediálta apoptózist tumor sejt kultúrákban [141], és néhány tanulmány szerint egyes tumor típusokban a MIF mennyisége megnövekedett a tumor sejtekben. [142, 143] MIF-knockout egerekből származó makrofágok LPS-sel való kezeléskor csökkent életképességet mutattak a vad egerekből származó kontrollhoz viszonyítva. Ez az emelkedett makrofág apoptózisnak köszönhető. Ezzel egy időben a MIF-knockout makrofágok csökkent TNF- α , IL-1 β és PGE₂ expressziót mutattak. [144] Az LPS behatás során a MIF szignifikánsan segítette a makrofágok túlélését és fokozta a gyulladást elősegítő funkciót az aktivációfüggő, p53-mediált apoptózis elnyomásán keresztül. A MIF okozta p53 gátlás az ERK1/ERK2, PLA₂, COX-2 aktiválódáshoz vezetett, a COX-2 fokozott működése pedig a PGE₂ mennyiségének emelkedését okozta.

Napjainkban egyre több bizonyíték szól arról, hogy a veleszületett immunválasz leállításának módja az aktivációfüggő makrofág apoptózis lenne. Így biztosítaná a szervezet, hogy az immunválasz mértéke arányos legyen a fertőzés mértékével. [145, 146] Ezen szabályozó funkciónak a magas MIF szint miatti akadályozottsága fontos lehet a gyulladással járó betegségek kórélettanában szerepet játszó túlzott mértékű gyulladással járó válaszban, mint pl. a szisztémás inflammatorikus reakció szindróma (SIRS).

Egy másik tanulmány szerint a MIF képes sejt felszíni receptorhoz való kötődés nélkül is hatást kifejteni. Képes a sejtmembránon endocitózissal átjutva bejutni a sejtbe és közvetlenül kötődni a citoplazmában található Jun-aktivációs domén kötő fehérje-1 (Jab-1) fehérjéhez, és ezáltal gátolja az ezen keresztül zajló jelátviteli útvonalakat. [147] A Jab-1 indukálja a c-Jun foszforilációját, mely fehérjének a sejtnövekedésben és az aktivátor protein-1 (AP-1) aktivációjában van szerepe. Az AP-1 egy transzkripciós faktor, ami számos gyulladáskeltő gén expresszióját eredményezi. A MIF és a Jab-1 közti közvetlen kapcsolat azt sugallja, hogy a MIF hatásspektrumának lehet egy gyulladáscsökkentő része is, ami ellentétben áll az eddig ismert gyulladáskeltő hatásával. De talán ez lehet a magyarázat a MIF harang-alakú dózis-hatás görbéjére is. [122]

1.5.4. A MIF szerepe egyes kórállapotokban

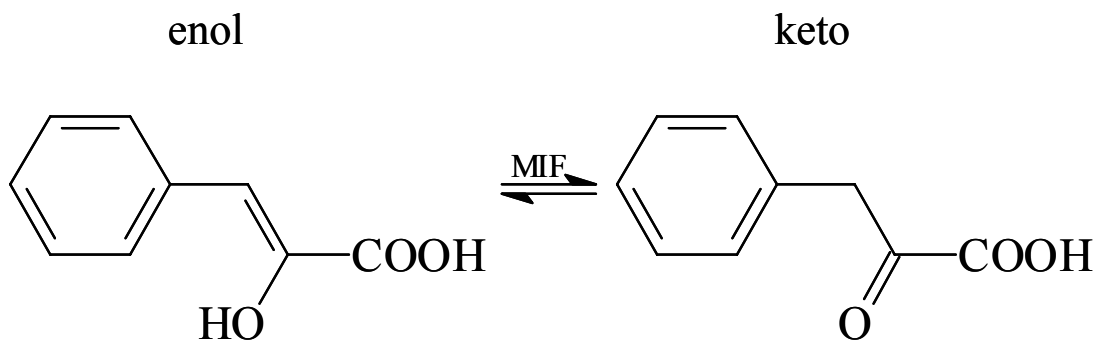
A MIF-nek ma már számos kórfolyamatban tulajdonítanak szerepet: endotoxémia és exotoxémia [121, 140, 148, 149], késői típusú hiperszenzitivitás [150], glomerulonefritisz [151, 152], artritisz [153–155], transzplantátum kilökődés [156, 157], tumor növekedés és angiogenezis [142, 143, 158–160], gyulladásos bélbetegségek [161], akut respiratórikus distressz szindróma [162], ateroszklerózis [163], anémia [164], enkefalomyelitisz [165]. A MIF bazális szérumszintje 3–5 ng/mL [166], szintje megemelkedik a legtöbb fertőző illetve nem fertőző gyulladásos állapotban. Reumatoid artritiszben szenvedő betegek synoviális folyadékában a MIF 5-10-szer magasabb koncentrációban van jelen, mint az egészséges önkéntesekben [167], és szintje korrelál a betegek klinikai állapotával. [168]

A MIF-re célzott terápiás stratégia lehetséges hatékonyságát támasztják alá a monoklonális anti-MIF antitestekkel végzett sikeres állatkísérletes modellvizsgálatok szepszisben, reumatoid artritiszben és tumorgenezisben. [149, 159, 160, 169] Bernhagen és mtsai. [121] intraperitoneálisan adagoltak egereknek LPS-t, vagy LPS és rekombináns MIF kombinációját. A rekombináns MIF növelte a LPS toxicitását ha LPS-sel együtt injektálták az egerekbe, azonban az állatok ellenállónak bizonyultak az endotoxin shockkal szemben ha a MIF aktivitást anti-MIF antitesttel neutralizálták. Ezt MIF-knockout génmanipulált egerekkel végzett kísérletek is megerősítették. [140] A MIF szerepét élő baktériumok által előidézett szepszisben is kimutatták. [149] A bakteriális peritonitist intraperitoneális E.coli baktérium injekciójával idézték elő. Az anti-MIF antitest megvédte az egereket a letális bakteriális peritonitistól. Ez a védelem akkor is fennállt, ha a terápiát csak 8 órával az infekció után kezdték meg. A MIF a Gram-pozitív baktériumok okozta immunválaszban is szerepet játszik. A toxikus shock szindróma toxin-1-gyel (TSST-1), valamint a Streptococcus exotoxin A-val kezelt makrofágok MIF-et szekretálnak. [148] A TSST-1-gyel triggerelt toxikus shock szindróma modellben az anti-MIF antitest megakadályozta a galaktózamin-érzékeny egerek halálát. Hasonló következtetés vonható le azon kísérletből, ahol MIF-knockout egerek rezisztensek voltak a Streptococcus exotoxin B által kiváltott shockkal szemben. [140] II-es típusú kollagénnel indukált egér artritisz modellben, a humán reumatoid artritisz jól ismert állatmodelljében, az anti-MIF antitest jelentősen csökkentette a gyulladásos választ. [154]

1.5.5. A MIF enzimaktivitása

A MIF a citokinek közül egyedülálló módon enzimaktivással rendelkezik, ezért citozimnek, vagy szekretált enzimnek is nevezik. Tautomeráz aktivitását először 1996-ban írták le D-dopakróm és L-dopakróm metil-észter szubsztrátokkal. [170]

A MIF tautomeráz reakciójának szubsztrátja lehet fenilpiruvát, p-hidroxi-fenilpiruvát is, melyek keto-enol tautomeriáját katalizálja a citokin. [171] (4. ábra) További szubsztrát lehet a 3,4-dihydroxifenilaminekróm és norepinefrinekróm is [172], ez felveti annak lehetőségét, hogy a MIF a catecholamin lebomlási termékek detoxifikálásában is szerepet játszhat.



4. ábra. A MIF fenilpiruvát tautomeráz enzimaktivitása. A felső nyíl irányába zajlik a ketonáz, az alsó nyíl irányába pedig az enoláz reakció.

A MIF további enzimaktivására aminosavszekvenciájából következtettek, mivel a CXXC motívum a tiol-protein-oxidoreduktázokra jellemző. Oxidoreduktáz aktivitása a konzervált ciszteinek közti diszulfidhidak képződését és redukcióját katalizálja. [173–175]

Bár jelenleg nem tisztázott, hogy a MIF katalitikus aktivitása egész pontosan milyen szerepet tölt be a MIF biológiai funkciójában, sokan feltételezik, hogy a MIF enzimaktivitásának kismolekulákkal történő gátlása hatékony terápiás lehetőség lehetne pl. az autoimmun gyulladásos betegségek gyógyításában. Miután mind a MIF 3D szerkezete, mind a tautomeráz reakciót katalizáló aktív centrum szerkezete ismertté vált, több munkacsoport is lehetséges enzim gátló molekulák tervezésébe kezdett. [176, 177]

Az N-acetil-p-benzoquinon-imin volt az első kismolekula, amiről leírták, hogy szuicid szubsztrátként inaktiválja a MIF dopakróm tautomeráz aktivitását. A MIF biológiai effektusát is csökkenti a glükokortikoidok által gátolt monocita TNF- α produkcóra. [64] Leírták, hogy a dopakróm tautomeráz aktivitást dopakróm analógok is gátolják. [178] Egyes imin-konjugátumok – melyeket aminosavak benzaldehidhez történő kapcsolásával állítottak elő – szintén gátolják mind a MIF tautomeráz reakcióját, mind a MIF bioaktivitását. [177] Szintén MIF gátló képességgel rendelkeznek az izoxazolinok, melyek a feniliminekből erednek. [165] Az (S,R)-3(4-hidroxifenil)-4,5-dihidro-5-izoxazol in vitro kísérletek során gátolta a MIF kiváltotta cPLA₂ expressziót, és csökkentette a MIF befolyásoló képességét a glükokortikoidok által gátolt TNF- α , PGE₂, COX-2 produkcóra.

A MIF fenilpiruvát tautomeráz aktivitását egyes gyulladáscsökkentő fitokemikáliák koncentrációfüggő módon gátolják. [65] Ezen vegyületek közül a kávésav bizonyult az egyik legpotensebb gátló molekulának mind a fenilpiruvát, mind a dopakróm tautomeráz aktivitást illetően.

2. Cikóriakávé fogyasztás egyes klinikai hatásainak vizsgálata

2.1. Bevezetés és célkitűzés

A növényi polifenolok sokféle biológiai hatásával kapcsolatban számtalan közlemény jelent meg az elmúlt évtizedekben. Epidemiológiai kutatások szerint polifenolokban gazdag ételek fogyasztása megakadályozhatja bizonyos betegségek kialakulását illetve progresszióját. [179] Fenolos vegyületek nagy mennyiségben találhatóak többek között zöldségekben, gyümölcsökben, kávéban, borban és olívaolajban. [180] A mérsékelt vörösbor fogyasztás kedvező hatásait egyes kardiovaszkuláris rizikófaktorokra már korábban bizonyították. [181] A másik széles körben kedvelt, polifenolban gazdag ital, a kávé lehetséges előnyei azonban még tisztázásra várnak. Az akut koronária szindróma kockázata a napi kávé fogyasztás függvényében egy J-alakú görbét mutatott. [182] A magasabb dózisok esetén tapasztalt kockázatnövekedés nagy valószínűséggel a *Coffea arabica* babból főzött kávé magas koffein tartalma miatti vérnyomás emelkedésnek tulajdonítható. Mindazonáltal a mérsékelt fogyasztás a nem fogyasztással szemben csökkent rizikót biztosított. Egy vizsgálat szerint a kávé trombocita aggregációt gátló hatása független a koffein tartalmától, inkább azon fenol vegyületeinek tulajdonítható, melyek képesek a trombocitákba inkorporálódni. [183] A kávéfogyasztásnak a kardiovaszkuláris kockázatra élethosszig kifejtett hatását nemrégiben két nagy kohorsz tanulmányban vizsgálták. Dózisfüggő védőhatást mutattak ki, mely kifejezettebb a női fogyasztók esetében. [184, 185] Ezen közlemények is a koffeintől függetlennek találták a leírt kedvező hatást.

A kávé bőségesen tartalmaz klorogénsavat, azaz kinasavval észterifikált kávéssavat, melyből a kávéssav hidrolízist követően válik abszorpcióra alkalmassá. [186] Az orálisan adagolt kávéssavnak mintegy 95%-a felszívódik a vékonybélből, csúcskoncentrációját a vérben a bevitel után két órával éri el. [187] A cikóriában (*Cichorium intybus*) is nagy mennyiségben található kávéssav és annak származékai, például a klorogénsav. A teljes növényből készült alkoholos (40%) extraktum (1:5) 13 g% kávéssav származékot tartalmaz. [188] A cikória pörkölt, darált gyökeréből készül a cikóriakávé, mely nem tartalmaz koffeint. [189] Pótkávéként vagy kávé-adalékként való használatának hosszú időre visszanyúló hagyománya van.

A gyulladáskeltő MIF citokinnek számos gyulladással járó kórfolyamatban tulajdonítanak jelentőséget. A MIF tautomeráz enzimaktivitását egyes gyulladásgátló fitokémikáliák koncentrációfüggő módon gátolják. [65] A kávésav bizonyult az egyik legjobb gátló molekulának mind a fenilpiruvát, mind a dopakróm tautomeráz aktivitást illetően. [65, 64] Továbbá a kávésavról és származékairól leírták, hogy in vitro és in vivo körülmények között gátolják a trombocita aggregációt [62, 63], ezt saját in vitro méréseink is megerősítették.

Jelen kísérletünkben célul tűztük ki a cikóriakávé fogyasztás klinikai hatásainak vizsgálatát a trombocita aggregációra, a hemorheológiai paraméterekre illetve a szérumban MIF koncentrációra.

2.2. Módszerek

Résztvevők:

A vizsgálatokat a PTE Regionális Kutatás Etikai Bizottság szabályainak megfelelően, annak engedélyével végeztük, melyek mindenben megfelelnek az Orvos-Világszövetség Helsinkai deklarációjának. Önkontrollos vizsgálatunkban 27 egészséges önkéntest vontunk be (13 nő és 14 férfi). Átlagos életkoruk 23 ± 0.4 év, átlagos testtömegük pedig 59.2 ± 2.5 kg illetve 85.5 ± 3.9 kg volt. A vizsgáltak közül öten dohányoztak és tízenheten rendszeresen fogyasztottak kávékat. A vizsgálat ideje alatt és az azt megelőző héten a résztvevők nem fogyaszthattak babkávét vagy teát, mert, bár alacsonyabb mennyiségben, de ezek is tartalmazzák a kávésavat. Szükség esetén koffein tablettát biztosítottunk a számukra. Ezen kívül a vizsgálatot megelőző egy héten és a vizsgálat ideje alatt nem szedhettek gyógyszereket illetve vitaminokat. Valamint tartózkodniuk kellett az alkoholfogyasztástól.

Vizsgálati protokoll:

A vizsgálatba bevont személyeknek az egy hetes periódus alatt napi 3 dl (20 g cikória granulátumból készített) cikóriakávét kellett elfogyasztaniuk reggelenként. Vizsgáltuk a cikóriakávé akut és krónikus hatását a trombocita aggregációra, a hemorheológiai paraméterekre és a MIF koncentrációra. Egyénenként három alkalommal történt vérvétel: a kávéfogyasztást megelőzően éhgyomorral, az első kávéfogyasztás után 2 órával, illetve az egy hetes rendszeres kávéfogyasztást követően a 8. napon. A vizsgálati protokollt összesen 24 résztvevő fejezte be, három önkéntes az utolsó vérvételen nem

vett részt. Ezen lemorzsolódott résztvevők nem tudták egy héten át mindennap elfogyasztani a kívánt napi cikóriakávé mennyiséget, mivel annak ízét kellemetlennek találták.

Trombocita aggregáció mérése:

3,8 %-os nátrium-citrát tartalmú vérvételi csövekbe vett vérmintákat 20 percig inkubáltuk 37°C-on. Majd a minták centrifugálását (900g, 10 perc) követően óvatosan eltávolítottuk a trombocita dús felülúszót. A maradék mintát ismételten lecentrifugáltuk (3600g, 10 perc) a referenciaként használt trombocita szegény plazma kinyeréséhez. A trombocita aggregáció vizsgálatát Carat Tx-4 négycsatornás trombocita aggregométerrel (Carat Diagnosztika Kft., Budapest) végeztük. Induktorként kollagént (2 µg/ml), adrenalint (10 µM) illetve kétféle koncentrációjú adenzin difoszfátot (5 és 10 µM ADP) használtunk. A mérés 10 perces időtartama alatt 37°C-os inkubációt és folyamatos mágneses keverést (1000 rpm) alkalmaztunk. A vizsgálatokat a vérvételt követő 2 órán belül végeztük el. [190]

Teljes vér illetve plazma viszkozitásának mérése:

A teljes vér és a plazma viszkozitás méréshez a vért lítium-heparin tartalmú vérvételi csövekbe vettük le, a méréseket a vérvételtől számított 2 órán belül végeztük el. A viszkozitás méréseket Hevimet 40 számítógépes kapilláris viszkoziméterrel (Hemorex Kft, Budapest) végeztük. [191]

Vörösvérsejt deformabilitás mérése:

A vörösvérsejtek deformabilitását LORCA (Laser-assisted Optical Rotational Cell Analyzer, RR Mechatronics, Hoorn, Hollandia) segítségével mértük. A készülék különböző nyíróerők (0.3–30 Pa) mellett lézer segítségével méri a vörösvérsejtek elongációs indexét, amelyből meghatározza a vörösvérsejtek deformabilitását. A mérésekhez 25 µl, etilén-diamin-tetraecetsavval (EDTA) alvadásgátolt vért használtunk 5 ml 30 ± 2 mPa·s viszkozitású polivinil-pirrolidon oldatba téve. A méréseket 37°C-on végeztük el. [192, 193]

Szérum MIF koncentráció meghatározása:

A vérmintákat antikoaguláns mentes vérvételi csövekbe gyűjtöttük. A szérum MIF

tartalmat enzim kapcsolt immunszorbens teszttel (MIF Duo set ELISA Development System from R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) detektáltuk betartva a gyártó előírásait.

Statisztikai kiértékelés:

Az eredményeket átlag \pm SEM formában adtuk meg. A kiértékelés során SPSS statisztikai programot használtunk. A vizsgált paraméterek normális eloszlást mutattak. Az időbeni változás, trend kiértékeléséhez ANOVA repeated measures tesztet alkalmaztunk. Az egyes napokon mért értékek további összehasonlításához illetve a csak két időpontban mért paraméterek kiértékeléséhez páros t-próbát alkalmaztunk. A statisztikai kiértékelés során $p < 0.05$ szignifikancia szintet alkalmaztunk.

2.3. Eredmények

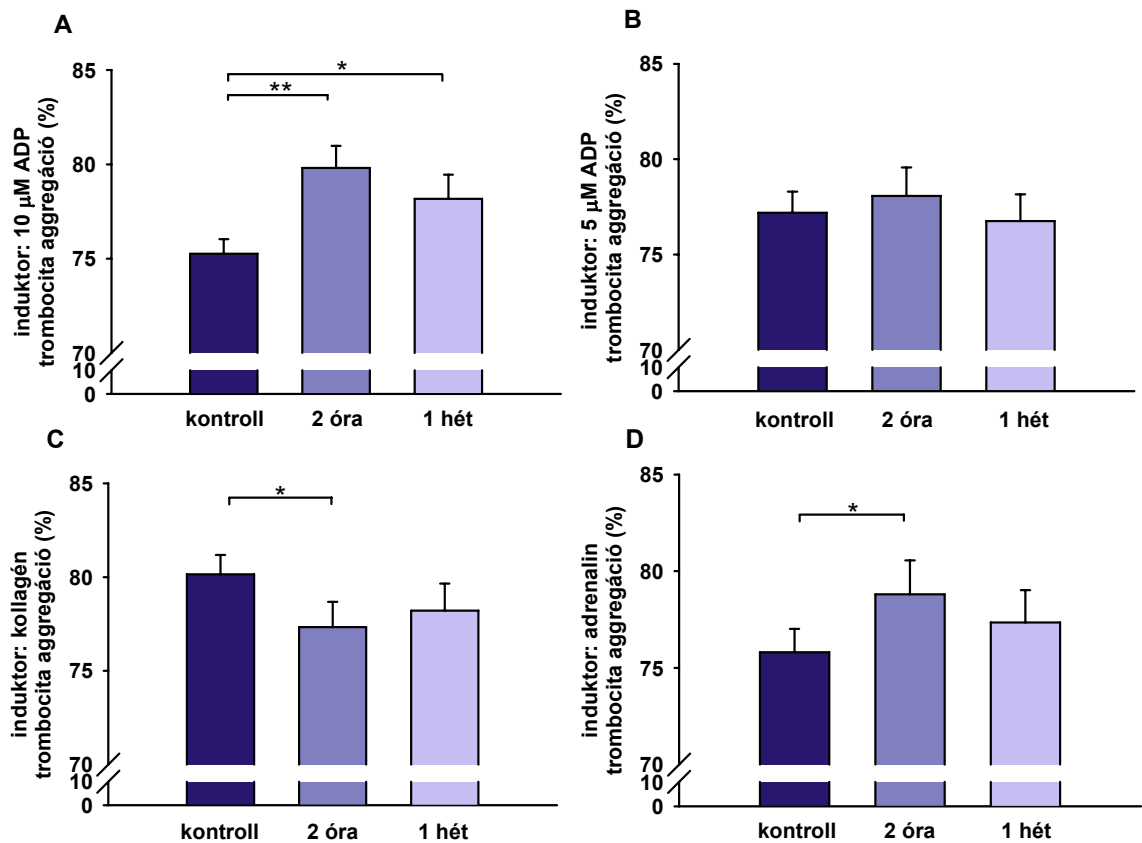
Trombocita aggregáció:

In vitro a kávésav hatékony trombocita aggregáció gátló képességgel rendelkezik. [62] Ezen eredményt előzetes vizsgálatunk során mi is megerősítettük: 1.2 mM kávésav a kollagénnel indukált aggregációt 50%-kal csökkentette in vitro.

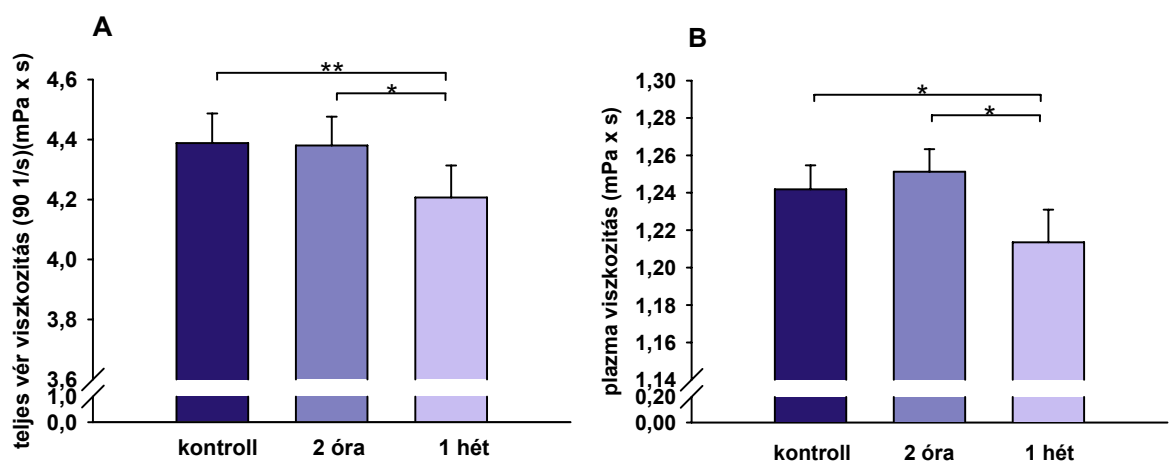
A cikóriakávé egy hetes fogyasztása során gyűjtött vérminták trombocita aggregációjának vizsgálatakor különböző induktorok esetében eltérő eredményeket kaptunk. Míg 5 μ M ADP induktor esetében nem találtunk szignifikáns változásokat, addig a 10 μ M ADP-vel indukált aggregáció mind a két órás, mind az egy hetes mérésnél fokozottnak mutatkozott. A kollagénnel indukált trombocita aggregáció a két órás mérésnél csökkent, az adrenalinnal indukált azonban nőtt. (5. ábra)

Teljes vér illetve plazma viszkozitás:

Az egy hetes rendszeres cikóriakávé fogyasztás szignifikánsan csökkentette a teljes vér viszkozitást (kontroll: 4.39 ± 0.10 mPa x s; 2 óra: 4.38 ± 0.10 mPa x s; 1 hét: 4.21 ± 0.11 mPa x s). Hasonlóan a plazma viszkozitás is csökkenést mutatott az egy hét elteltével levett mintákban (kontroll: 1.24 ± 0.01 mPa x s; 2 óra: 1.25 ± 0.01 mPa x s; 1 hét: 1.21 ± 0.02 mPa x s). (6. ábra)



5. ábra. Cikóriakávé fogyasztás hatása a trombocita aggregációra (A) 10 μ M ADP, (B) 5 μ M ADP, (C) 2 μ g/mL kollagén illetve (D) 10 μ M adrenalin induktor esetében. (átlag \pm SEM) (*p<0.05, **p<0.01)



6. ábra. Cikóriakávé fogyasztás hatása (A) a teljes vér viszkozításra és (B) a plazma viszkozításra. (átlag \pm SEM) (*p<0.05, **p<0.01)

A vérkép alapvető paramétereit, mint például hematokrit és vörösvérsejtszám nem mutattak változást. A fibrinogén koncentráció – mely a plazma viszkozitás egyik fő meghatározója – sem változott a vizsgálat ideje alatt. (1. táblázat)

	Kontroll	1 hét
Vörösvérsejtszám (T/L)	4.79 ± 0.09	4.74 ± 0.09
Hemoglobin (g/L)	143.81 ± 2.57	142.33 ± 2.84
Hematokrit (%)	41.82 ± 0.59	41.38 ± 0.65
Fibrinogén (g/L)	2.63 ± 0.09	2.65 ± 0.11
Trombocitaszám (G/L)	241.93 ± 8.04	241.67 ± 9.25

1. táblázat. Cikóriakávé fogyasztás hatása a vérkép paramétereire. (átlag±SEM)

Vörösvérsejt deformabilitás:

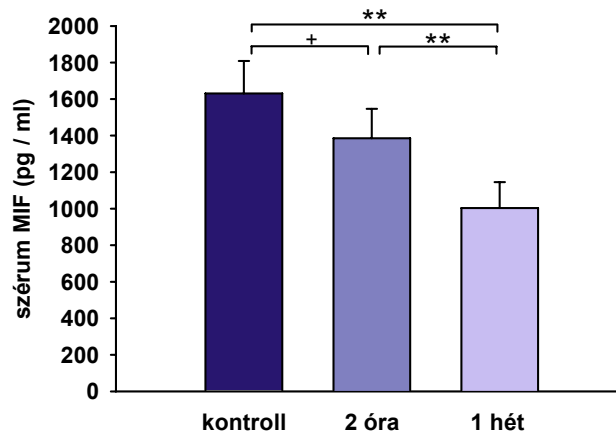
Az egy hetes cikóriakávé fogyasztást követően minden 30 Pa-nál kisebb nyírófeszültség esetén a vörösvérsejt deformabilitás szignifikáns növekedését tapasztaltuk. (2. táblázat)

Nyírófeszültség (Pa)	Kontroll	2 óra	1 hét
0.3	0.0545 ± 0.0018	0.0532 ± 0.0017	0.0594 ± 0.0018 ** ##
0.53	0.1094 ± 0.0027	0.1089 ± 0.0024	0.1141 ± 0.0030 * #
0.95	0.2067 ± 0.0027	0.2065 ± 0.0029	0.2120 ± 0.0033 ** #
1.69	0.3176 ± 0.0027	0.3177 ± 0.0027	0.3235 ± 0.0028 * #
3	0.4194 ± 0.0019	0.4186 ± 0.0023	0.4240 ± 0.0024 * #
5.33	0.4974 ± 0.0014	0.4966 ± 0.0020	0.5015 ± 0.0019 ** ##
9.49	0.5497 ± 0.0013	0.5493 ± 0.0018	0.5533 ± 0.0016 ** ##
16.87	0.5961 ± 0.0013	0.5957 ± 0.0016	0.5985 ± 0.0015 ** ##
30	0.6276 ± 0.0008	0.6277 ± 0.0011	0.6290 ± 0.0011

2. táblázat. Cikóriakávé fogyasztás hatása a vörösvérsejt deformabilitásra különböző nyíróerők alkalmazása mellett. (átlag±SEM) (kontrollhoz képesti eltérés: *p<0.05, **p<0.01) (2 órákor vett mintához képesti eltérés: #<0.05, ##p<0.01)

Szérum MIF koncentráció:

Cikóriakávé fogyasztás hatására a szérum MIF szintekben jelentős, szignifikáns csökkenés volt tapasztalható egy hét elteltével (kontroll: 1630 ± 178 pg/ml; 2 óra: 1385 ± 160 pg/ml; 1 hét: 1003 ± 142 pg/ml). (7. ábra)



7. ábra. Cikóriakávé fogyasztás hatása a szérum MIF szintre.
($\text{átlag} \pm \text{SEM}$)(** $p < 0.01$, + $p = 0.06$)

2.4. Eredmények megbeszélése és következtetés

Vizsgálatunk során a cikóriakávé fogyasztással összefüggésbe hozható nem kívánatos eseményt (allergia, mellékhatás stb.) nem észleltünk, tehát a cikóriakávé rövidtávon jól tolerálható diétás intervenció lehetőségét nyújtja fenolos növényi hatóanyagok bevitelére. A trombocita aggregációra és hemorheológiai paraméterek alakulására gyakorolt hatásai azonban nagy valószínűséggel nem köthetők egyetlen vegyülethez, hanem sokkal inkább a cikóriakávéból abszorbeált számos hatóanyag együttesének tulajdoníthatók.

A cikóriakávé fogyasztás trombocita aggregációra kifejtett hatása úgy tűnik függ az alkalmazott induktortól. Az in vivo aggregáció gátló aktivitás sokkal alacsonyabb volt, mint azt a kávésavval – ezen ital legfőbb növényi fenolvegyületével – végzett előzetes in vitro vizsgálatok alapján vártuk.

Az egy hetes cikóriakávé fogyasztás azonban szignifikánsan javította a hemorheológiai paramétereket, azaz a plazma és teljes vér viszkozitást, valamint a vörösvérsejt deformabilitást. Ezen változások arra utalnak, hogy a rendszeres cikóriakávé fogyasztás kedvező hatású lehet a mikrocirkuláció egyes rendellenességeinek megelőzésében. A teljes vér viszkozitás csökkenése feltehetően nagyrészt a vörösvérsejt deformabilitás növekedésének tulajdonítható. Igen figyelemre méltó a változatlan fibrinogén szint mellett tapasztalt szerény, de szignifikáns plazma viszkozitás csökkenés. További vizsgálatok szükségesek a pontos hatásmechanizmusok tisztázásához, valamint azonosítóanyagok azonosításához, melyek a cikóriakávé leírt hatásaiért felelősek.

Baskurt és mtsai. [194] a vörösvérsejt deformabilitás szignifikáns csökkenését figyelték meg szeptikus állapotokban 5 Pa-nál kisebb nyíróerők alkalmazásakor mind patkányok, mind emberek esetében. Az emelkedett MIF értékek a szeptikus állapot elfogadott indikátorai. [121] A kávésavban gazdag burgonyahéj extraktumról bebizonyították, hogy megvédi a vörösvérsejteket az oxidatív károsodástól, melyről ismert, hogy csökkenti a sejt deformabilitást. [195] A gyulladásgátló fenolokban (beleértve a kávésavat) gazdag cikóriakávé napi fogyasztása egy hét elteltével jelentősen csökkentette a vizsgálatunkban résztvevő egészséges önkéntesek szérum MIF szintjét, ezzel párhuzamosan javította a vörösvérsejt deformabilitást. További vizsgálatok szükségesek annak eldöntéséhez, hogy e két jelenség között van-e oki összefüggés. Tekintettel arra, hogy a MIF adhéziós molekulák expresszióját indukálja az endotél sejteken [196], a MIF szintek csökkenése kardiovaszkuláris rizikó szempontjából preventív hatású lehet, mivel a monocita adhézió és emigráció az ateroszklerózis kialakulásának egy kulcseleme.

Egy, a közleményünk megjelenését követően publikált tanulmány a mi adatainkkal egybehangzó eredményre jutott a polifenolokban gazdag táplálék szérum MIF szintre gyakorolt hatását tekintve. Broekhuizen és mtsai. [197] vizsgálatában a kardiovaszkuláris rizikófaktorokkal rendelkező résztvevők polifenolban gazdag szőlőből és almából készült extraktumot fogyasztottak négy héten át napi rendszerességgel, ami 11%-kal csökkentette a bazális plazma MIF szintjüket.

Eredményeink alapján úgy tűnik, hogy vizsgálatunk jó kiindulási alap a cikóriakávében található fenolvegyületek antitrombotikus, gyulladásgátló, illetve kedvező hemorheológiai hatásainak további célzott vizsgálataihoz.

3. PCB és PCDD/F vegyületek jelenlétének vizsgálata magyar anyatejmintákban

3.1. Bevezetés és célkitűzés

Napjainkban a tudományos és ipari fejlődés hatására drámaian megnőtt a környezetbe kerülő organohalogen POP szennyezőanyagok mennyisége. Zsírolékonyságuk és rendkívüli stabilitásuk miatt nagymértékű biológiai felhalmozódást mutatnak a táplálékláncban. [75] Ezen vegyületek megtalálhatók a humán anyatejben is annak nagy zsírtartalma miatt. [198, 199] Az anyatejjel táplált újszülöttek könnyen nagy mennyiségű POP expozíciónak lehetnek kitéve ezen érzékeny életszakaszban, mely a szervek fejlődése és érése szempontjából meghatározó. [200, 201] Számos tanulmány igazolta, hogy az anyatejen keresztüli POP expozíció az újszülöttek illetve csecsemők károsodott neurológiai, immunológiai és endokrinológiai fejlődéséhez vezethet. [93–95, 100, 101]

Az elmúlt 30 év során számos vizsgálatot végeztek az anyatej organoklorid kontaminációjával kapcsolatban, és a világ sok országából állnak adatok rendelkezésre a POP anyatejbeli szintjére vonatkozóan. Azonban a magyar anyatejminták POP tartalmára vonatkozóan jelenleg nincsenek kielégítő információink. [110–112, 202] Ismert, hogy az anyatej POP tartalma visszatükrözi az anya hosszútávú expozícióját és egyben az anyatejjel táplált újszülött expozíciójára vonatkozóan is információt nyújt. Az anyatejminták gyűjtése és analízisa egy bevált nem-invazív módszer a POP vegyületek monitorozására humán mintákban.

Jelen vizsgálatunkban célul tűztük ki, hogy megbízható információkat nyerjünk magyar anyatejminták POP tartalmára vonatkozóan és összehasonlítsuk más európai országok közölt adataival. Ezen túl az anyatejminták POP koncentrációjának időbeli változását is vizsgáltuk. Az így nyert adatok segítségével elvégeztük az újszülöttek anyatejen keresztüli POP expozíciójának becslését.

3.2. Módszerek

Résztevők:

A vizsgálatokat a PTE Regionális Kutatás Etikai Bizottság és az Egészségügyi

Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottság (ETT TUKEB) szabályainak megfelelően, azok engedélyével végeztük, melyek mindenben megfelelnek az Orvos-Világszövetség Helsinki deklarációjának. Vizsgálatunkba 34 olyan egészséges anyát vontunk be, akik érett, egészséges újszülöttet hoztak világra a Baranya Megyei Kórház Szülészeti Osztályán 2007-ben, és az első 3 hónapban kizárólag anyatejjel táplálták őket, valamint önként jelentkeztek az anyatejdonációra. A résztvevők általános jellemzőit a 3. táblázat tartalmazza.

	átlag ± SD
Anyai életkor (év)	26.7 ± 4.9
Anyai BMI terhesség előtt (kg/m ²)	23.8 ± 4.6
Anyai BMI szülés előtt (kg/m ²)	29.1 ± 4.2
Anyai testsúlynövekedés mértéke ^a	0.24 ± 0.10
Terhességi hét (hét)	39.4 ± 1.2
Születési súly (g)	3370 ± 560
Születési hossz (cm)	50.4 ± 2.7
Nem (fiú/lány)	20/14 (59%/41%)
Paritás (első/második gyermek)	26/8 (76%/24%)

3. táblázat. A vizsgálatban résztvevő anyák és újszülöttjeik általános jellemzői.

^a Testsúlynövekedés mértékének számítása: [(anyai testsúly szülés előtt) - (anyai testsúly terhesség előtt)]/(anyai testsúly terhesség előtt)

Anyatejminták gyűjtése:

Vizsgálatunkban összesen 34 résztvevőtől gyűjtöttünk 50-50 ml anyatejmintát a szülést követően 3 különböző alkalommal. Nem minden anya tudott minden alkalommal tejmintát adni, valamint az idő előrehaladtával a még kizárólag szoptató anyák száma csökkent, ezért az egyes időpontokban gyűjtött minták száma kis eltérést mutat.

Az első minta gyűjtése a szülést követő 5. napon (n=29), a következő a 12. (n=28), a harmadik pedig a 84. napon (n=26) történt. A mintákat a reggeli első szoptatás alkalmával gyűjtöttük acetonnal előzőleg átöblített és kiszárított üveg gyűjtőedényekbe. A mintákat a vizsgálatok elvégzéséig -20°C-on tároltuk.

Anyatejminták analízise:

Az anyatejminták POP tartalmának mérése Milánóban, az Istituto di Ricerche Farmacologiche “Mario Negri” intézetben történt. Az analitikai eljárást az Amerikai Környezetvédelmi Ügynökség előírásai (US EPA method 1613) alapján végeztük kis módosítással. [203]

Zsírtartalom extrahálása:

A felolvasztott, homogenizált mintákhoz $^{13}\text{C}_{12}$ jelölt PCB és PCDD/F kongenerekből álló belső standardotadtunk. A minták zsírtartalmát Accelerated Solvent Extractor (Dionex ASE 300; Dionex, Sunnyvale, CA, USA) segítségével extraháltuk. A homogenizált tejet a 66 ml térfogatú extraháló kamrában egy hidromártix réteg tetejére rétegeztük rá. Az extrakcióhoz dietil-éter és izopropanol 2:1 keverékét használtuk, az eljárást 2 ciklusban, 1500 psi nyomáson, $+120^{\circ}\text{C}$ hőmérsékleten végeztük. Ezt követően az extraktum teljes folyadéktartalmát elpárologtattuk, majd gravimetriáson meghatároztuk a zsírtartalmat.

Többlépcsős tisztítási eljárás:

A mintákat 2 órán át tömény kénsavval (98%) kezeltük, majd Extrelut oszlopokra (Merck, Németország) vittük fel őket tisztítás céljából. Másnap az oszlopokat 200 ml n-hexánnal eluáltuk, majd az eluátumot kb. 1 ml végtérfogatra koncentráltuk rotavaporral. A második tisztítási lépésben elválasztottuk egymástól a PCB illetve a PCDD/F kongenereket egy 400°C -on aktivált alumínium-oxid oszlop segítségével. Ennek során az előző lépésben bekonzentrált eluátumot az alumínium-oxid oszlop tetejére helyeztük, majd az oszlopot 9 ml n-hexánnal tisztítottuk, annak érdekében, hogy a POP-okkal interferáló szennyező vegyületeket eltávolítsuk. Ezt követően az oszlopra további 6 ml CCl_4 oldószert vittünk fel, mely frakcióba a nem dioxinszerű PCB-k (non-dioxin-like PCB, NDL-PCB) és a mono-orto dioxinszerű PCB-k (dioxin-like PCB, DL-PCB) oldódtak. Majd további 7 ml CH_2Cl_2 -otadtunk az oszlopra, mely frakcióba a PCDD-k, PCDF-k és a non-orto DL-PCB kongenerek oldódtak. Az így kapott frakciókat enyhe nitrogénáram alatt közel kiszáradásig koncentráltuk szobahőmérsékleten, majd 50 μl izooktánnal reszolubilizáltuk.

PCB és PCDD/F tartalom mérése:

A vegyületek nevét a Nemzetközi Elméleti és Alkalmazott Kémiai Egyesület

(International Union of Pure and Applied Chemistry, IUPAC) által meghatározott IUPAC számok segítségével adtuk meg. A következő PCB kongenereket vizsgáltuk: 28, 52, 77, 81, 101, 105, 114, 118, 123, 126, 138, 153, 156, 157, 167, 169, 170, 180 és 189. Tizenhét 2,3,7,8-klór-szubsztituált PCDD és PCDF kongener jelenlétét vizsgáltuk.

A PCB és PCDD/F tartalom kvantitatív meghatározását nagyfelbontású gázkromatográfjal kapcsolts nagyfelbontású tömeg-spektrométer segítségével detektáltuk. Egy TRACE GC 2000, Thermo Finnigan (Thermo Fisher Scientific) készülékkel összekapcsolt Mat 95 XP Mass Spectrometert szelektív ion monitoring üzemmódban használtunk. A készüléket BXP-DXN kapilláris oszloppal (60 m x 0.2 mm x 0.25 μ m, SGE, Analytical Science, Melbourne, Ausztrália) szereltük fel.

A PCDD/F analízishez a splitless injektálást 280°C-on végeztük. Vivógázként 2 ml/perc áramlási sebességű héliumot használtunk. A kapilláris oszlop hőmérsékletének programja: 160°C (1 perc) \rightarrow 2,5°C /perc \rightarrow 300°C (8 perc).

A PCB analízishez vivógázként 1 ml/perc áramlási sebességű héliumot használtunk. A kapilláris oszlop hőmérsékletének programja: 125°C (2 perc) \rightarrow 7,5°C /perc \rightarrow 190°C (0 perc) \rightarrow 2°C /perc \rightarrow 280°C (7 perc).

Kimutatási határnak (limit of detection, LOD) 3:1 jel-zaj arányt választottunk. Az analitikai megbízhatóság biztosításáért minden esetben vakmintákat és tesztmintákat is vizsgáltunk. A minőségbiztosítási és minőségellenőrzési protokollokat az US EPA method 1613 alapján állítottuk fel. [203]

Újszülöttek POP expozíciójának becslése:

Az anyatejen keresztüli POP expozíció becslésekor az anyatej szennyezőanyag tartalma mellett fontos az elfogyasztott anyatej mennyisége is. A kizárólag anyatejjel táplált újszülöttek testtömegét 24 órán át mértük minden szoptatás előtt és után. Ebből számítottuk ki a napi anyatejfogyasztást. A vizsgálatot a születésüket követő 3 hónap során rendszeresen, kéthetente megismételtük (1., 3., 5., 7., 9., 11. és 13. hét).

Statisztikai kiértékelés:

Az eredményeket átlag \pm SEM formában adtuk meg. A kiértékelés során SPSS statisztikai programot használtunk. A statisztikai kiértékelés során $p < 0.05$ szignifikancia szintet alkalmaztunk. A vizsgált paraméterek, azaz mind a zsírtartalom, mind az egyes POP kongener koncentrációk lognormális eloszlást mutattak, ezért log transzformációt követően végeztük el a statisztikai elemzéseket. Ezen paraméterek időbeni

változásának, trendjének kiértékeléséhez ANOVA repeated measures tesztet alkalmaztunk. Az egyes napokon mért értékek további összehasonlításához páros t-próbát illetve Pearson korrelációt alkalmaztunk. Többszörös lineáris regresszió analízis segítségével vizsgáltuk a POP értékek összefüggését az anyák olyan jellemzőivel, mint anyai életkor, terhesség előtti anyai BMI, anyai testsúlynövekedés mértéke a terhesség során illetve paritás. A LOD alatti értékeket a kimutatási határ felével vettük figyelembe a statisztika során. A DL-PCB és PCDD/F koncentrációkat a WHO által ajánlott TEF faktorok [106] segítségével TEQ-ben is kifejeztük.

Az újszülöttek anyatej általi POP expozíciója függ a fogyasztott anyatej mennyiségétől, az anyatej zsírtartalmától, valamint annak POP tartalmától. A becslés során a TEF-fel rendelkező kongenereket, azaz a DL-PCB, PCDD és PCDF anyatejbeli koncentrációját vettük alapul. Az expozícióbecslést a szülést követő 5., 12. és 84. napon vett minták adataiból végeztük el, a következő sztochasztikus képlet segítségével:

$$\text{napi fajlagos anyatejfogyasztás (g/ttkg)} \times \text{zsír (g\%)} \times \sum_{in} (C_i \times \text{TEF}_i) \text{ (pg TEQ/g zsír)}$$

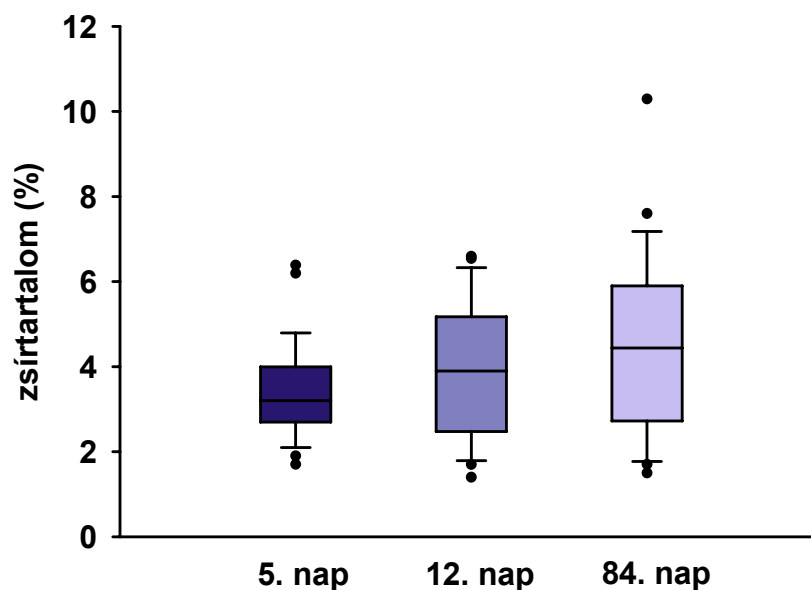
100

Az újszülöttek testtömege és napi anyatejfogyasztása normális eloszlást mutatott. Mivel a napi anyatejfogyasztás mérése és az anyatejminták gyűjtése nem azonos napon történtek, ezért a testtömegekre vonatkoztatott napi anyatej fogyasztási adatokra maximum-likelihood módszer segítségével 4 paraméteres lognormális modellt illesztettünk, és az így nyert tejfogyasztási adatokat használtuk az expozícióbecslés során.

3.3. Eredmények

Anyatejminták zsírtartalma:

Az anyák tejmintáinak zsírtartalma minden vizsgálati időpontban nagy szórást mutatott. (8. ábra) Az átlagos zsírtartalom alacsonyabb volt a szoptatás elején (5. nap: 3.37 ± 1.11 %; 12. nap: 3.97 ± 1.48 %; 84. nap: 4.40 ± 2.91 %), habár nem detektáltunk szignifikáns változást az anyatej zsírtartalmában a szoptatási időszak során ($p=0.2$). Az egyes anyák három különböző alkalommal nyert tejmintáinak zsírtartalmai nem korreláltak egymással.



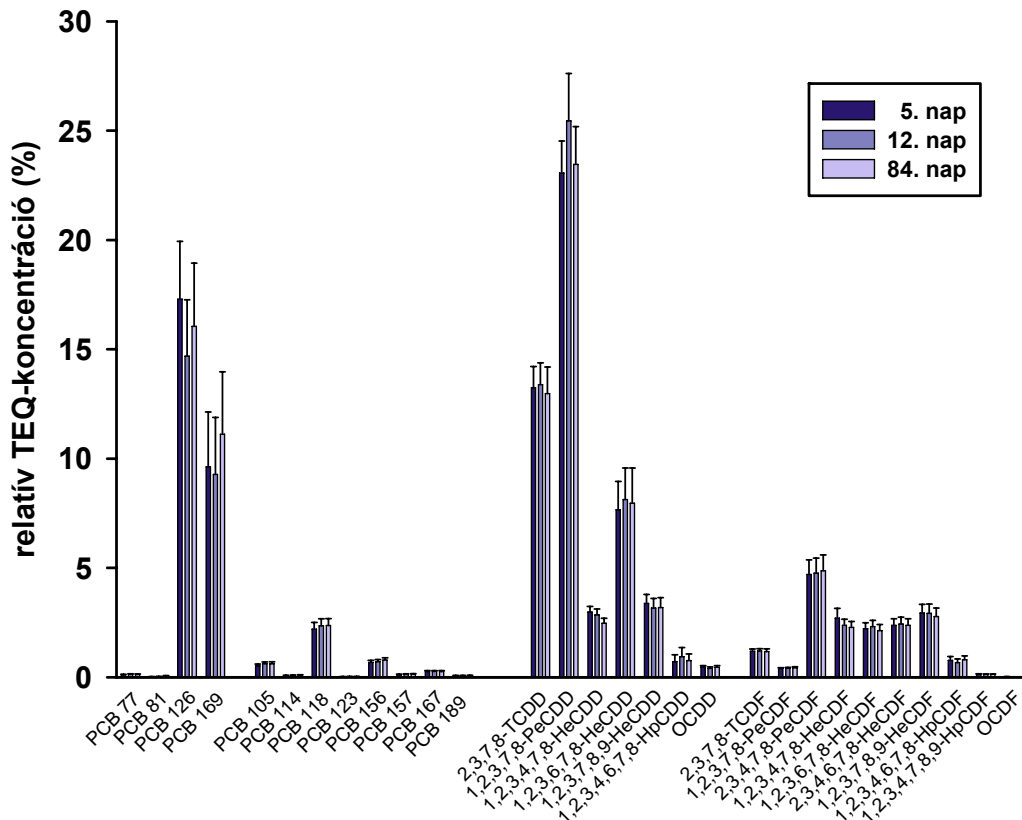
8. ábra. Az anyatej zsírtartalmának változása a szoptatási időszak során.

PCB koncentráció:

A három időpontban mért egyes PCB kongener koncentrációkat az 1. függelék tartalmazza. A domináns kongenerek a NDL-PCB-k csoportjába tartoztak: 153, 180, 138, és 101. Mindhárom mérési alkalommal ezen négy kongener összessége a teljes PCB koncentrációnak több mint 75%-át adta. A legnagyobb mennyiségben jelenlévő DL-PCB kongener a PCB-118 (mono-orto DL-PCB) és a PCB-77 (non-orto DL-PCB) volt. Mindhárom mérési alkalommal a DL-PCB vegyületek a teljes PCB koncentrációnak csupán 11%-át tették ki.

PCDD/F koncentráció:

A három időpontban mért egyes PCDD és PCDF kongener koncentrációkat az 1. függelék tartalmazza. A legnagyobb mennyiségbe jelenlévő PCDD/F vegyület az OCDD volt. A koncentrációkat dioxin toxikus egyenértékben (TEQ) is kifejeztük. Az egyes DL-PCB és PCDD/F kongenerek teljes (DL-PCB+PCDD/F)-TEQ-hez viszonyított arányát a 9. ábra mutatja. TEQ-ben kifejezve a domináns kongener az 1,2,3,7,8-PeCDD és a PCB-126 volt. Mindhárom mérési alkalommal ezen két kongenerből számított TEQ érték a teljes (DL-PCB+PCDD/F)-TEQ koncentrációnak kb. 40%-át adta. Mindhárom mérési alkalommal a DL-PCB kongenerek összesen kb. 30%-át tették ki a teljes (DL-PCB+PCDD/F)-TEQ-nek.



9. ábra. Az egyes DL-PCB, PCDD és PCDF kongenerek teljes TEQ-hez viszonyított aránya. A teljes TEQ-et a DL-PCB és PCDD/F kongenerek TEQ értékeinek összegzésével nyertük. (átlag±SEM)

POP értékeket befolyásoló tényezők:

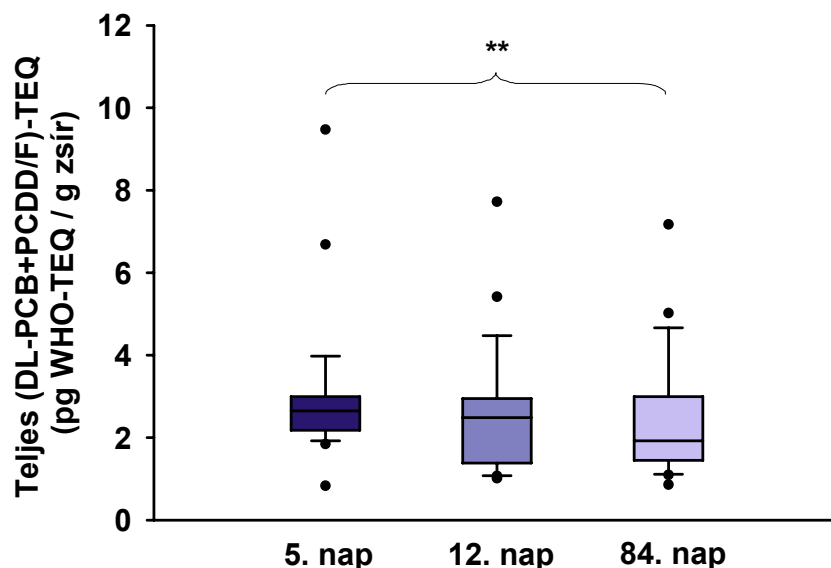
A szülést követő 12. napon mért anyatejbeli POP koncentrációértékek kapcsolatát vizsgáltuk az anyai POP forrással összefüggő egyes jellemzőkkel. A paritás szignifikánsan negatívan befolyásolta a teljes ND-L-PCB, teljes PCB valamint a teljes (DL-PCB+PCDD/F)-TEQ értékeket ($p < 0.05$). A vizsgált koncentrációkat az anyai életkor, a terhesség előtti anyai BMI vagy az anyai testsúlynövekedés mértéke a terhesség során nem befolyásolta.

Anyatejminták POP tartalmának időbeli változása a szoptatás során:

A szoptatás során három alkalommal mért PCB kongener koncentrációk erősen korreláltak egymással. A PCB kongener értékek csökkentek a szoptatás első három

hónapja során, jöllehet ezen csökkenő trend csak a következő PCB kongenerek esetében volt szignifikáns: 114, 118, 123, 126, 156, 157, 167, 169, 170, 189, valamint teljes NDL-PCB, teljes DL-PCB és teljes PCB. (1. függelék) A PCB kongenerek csökkenése sokkal kifejezettebb volt az 5.–12. nap között, 2% – 34% (átlagosan 13%), kivéve a PCB-81 és PCB-123 kongenereket, melyek enyhe emelkedést mutattak. Ezt követően a 12. nap és a 84. nap között a koncentrációk változása -7% és +14% közt szórt, az átlagos változás 0.2% volt.

A szoptatás során három alkalommal mért PCDD/F kongener koncentrációk erősen korreláltak egymással. A PCDD/F kongener értékek csökkentek a szoptatás első három hónapja során, jöllehet ezen csökkenő trend csak a következő kongenerek esetében volt szignifikáns: 2,3,7,8-TCDD, 1,2,3,7,8-PeCDD, 1,2,3,4,7,8-HeCDD, 1,2,3,6,7,8-HeCDD, OCDD és OCDF. (1. függelék) Ezen felül a teljes PCDD/F-TEQ és a teljes (DL-PCB+PCDD/F)-TEQ is szignifikánsan csökkent. (10. ábra) A több klórt tartalmazó PCDD/F kongenerek gyorsabban eliminálódtak, mint a kevesebb klórt tartalmazók. A PCDF-k gyorsabban eliminálódtak, mint a PCDD vegyületek. (4. táblázat) A magas klórtartalmú OCDF legalább kétszer gyorsabban eliminálódott, mint más kongenerek. A csökkenés sokkal kifejezettebb volt az 5.–12. nap között, átlagosan 16%, míg a 12. nap és a 84. nap között a koncentrációk átlagosan 7%-kal csökkentek.



10. ábra. Az anyatej teljes (DL-PCB+PCDD/F)-TEQ változása a szoptatási időszak során. (** $p < 0.01$)

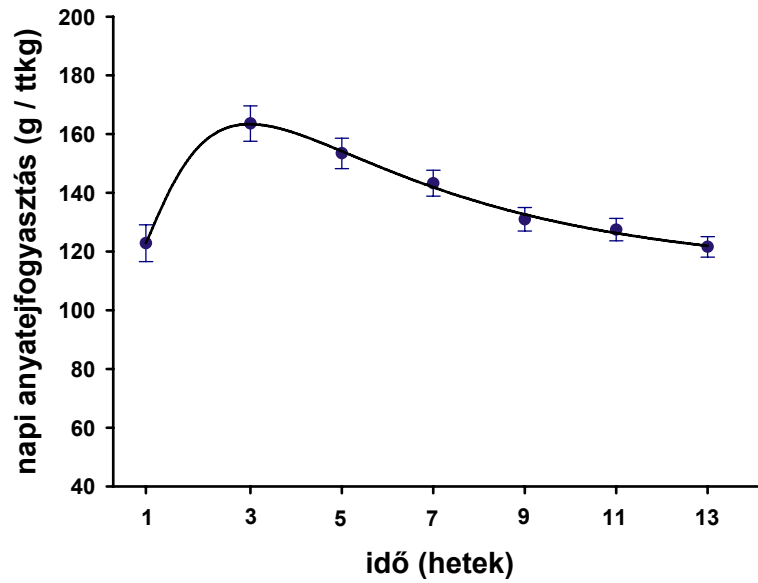
Kongener	12. nap	84. nap
2,3,7,8-TCDD	-12	-18
2,3,7,8-TCDF	-8	-12
1,2,3,7,8-PeCDD	-3	-22
Teljes PeCDF	-12	-14
Teljes HeCDD	-12	-22
Teljes HeCDF	-11	-11
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	+7	-24
Teljes HpCDF	-20	-18
OCDD	-28	-28
OCDF	-59	-63
Teljes PCDD/F-TEQ	-7	-19

4. táblázat. Az anyatej PCDD és PCDF kongener koncentrációk átlagos változása (%) a szoptatás első három hónapja során. Az értékeket a szülést követő 5. napon mért koncentrációkhoz viszonyítottuk.

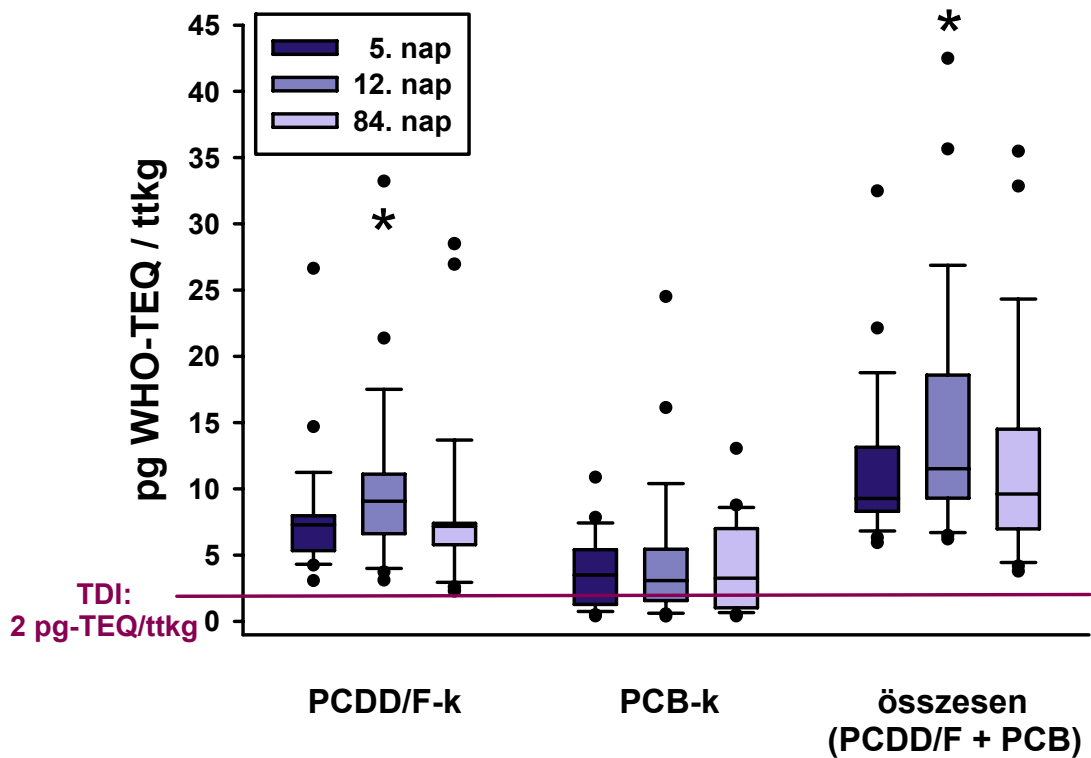
Újszülöttek POP expozíciójának becslése:

Az újszülöttek testtömege folyamatosan és gyors ütemben nőtt a születésük után ($p < 0.001$). A 24 óra alatti anyatejfogyasztás is szignifikánsan nőtt a szoptatás előrehaladtával ($p < 0.001$). Az újszülöttek napi anyatejfogyasztása és testtömege erősen korrelált egymással minden vizsgálati napon, ezért az expozícióbecslés során a testtömegekre vonatkoztatott napi anyatejfogyasztást használtuk. Az így számított anyatejfogyasztás is szignifikánsan változott az első három hónap alatt ($p < 0.001$), meredeken nőtt a 3. hétig (átlag \pm SD: 163 ± 35 g/kg nap), majd a következő hetekben fokozatosan csökkent a 13. hét végéig (121 ± 19 g/kg nap). (11. ábra)

Az újszülöttek anyatej általi POP expozíciójának becslését a fentebb ismertetett képlet segítségével végeztük. A DL-PCB, PCDD és PCDF kongenerek általi összexpozíció a szoptatási időszak első 3 hónapjában végig magasabb volt, mint a JECFA és a SCF szervezetek által megállapított TDI, azaz mint 2 pg-TEQ/ttkg. Az újszülöttek átlagos POP expozíciója (5. nap: 11.5 pg-TEQ/ttkg; 12. nap: 14.7 pg-TEQ/ttkg; 84. nap: 11.9 pg-TEQ/ttkg) öt- hétszer magasabb volt, mint a TDI. A POP expozíció a 12. napon szignifikánsan magasabb volt, mint az 5. illetve a 84. napon. (12. ábra)



11. ábra. Az újszülöttek testtömeghez viszonyított napi anyatejfogyasztása a szoptatás első 3 hónapjában. (átlag±SEM) Adatainkra lognormális görbét illesztettünk.



12. ábra. Az újszülöttek anyatej általi POP expozíciója a szoptatás első három hónapjában. (*p<0.05) (TDI: a tolerálható napi bevétel)

3.4. Eredmények megbeszélése és következtetés

Ez az első vizsgálat, mely egyéni magyar anyatejminták POP tartalmáról szolgáltat adatokat. Általánosságban elmondható, hogy a jelen vizsgálat során mért koncentrációk alacsonyabbnak tűnnek, mint más európai országok nemrégiben közölt adatai. [204–206] Ezen alacsony szinteket számos lehetséges ok magyarázhatja. Vizsgálatunk alanyai fiatal és egészséges nők voltak, akiknek nagy valószínűséggel nem volt magasabb expozíciós kockázatuk, pl. munkával kapcsolatos tevékenységek vagy szennyezett ételek fogyasztása által. Az észlelt viszonylag alacsony anyatejbeli POP szintek talán – legalább részben – magyarázhatók a hazai alacsony tengeri hal és tenger gyümölcsei fogyasztással [207, 208], hiszen a tengeri hal fogyasztását tekintik a humán POP expozíció egyik fő forrásának. [209–212]

Csak kevés korábbi tanulmány áll rendelkezésre a magyar anyatej POP tartalmával kapcsolatban: az ország a WHO által koordinált, az anyatej PCDD/F és PCB tartalmával kapcsolatos nemzetközi expozíciós kutatás mind a négy fordulójában részt vett. [110–112, 202] A fenti tanulmányokban – ahol gyűjtött és összeöntött, ún. pooled anyatejmintákat vizsgáltak – Magyarországot rendre a legkevésbé szennyezett európai országgént rangsorolták illetve jellemezték. Egyéni minták elemzésével kapott eredményeink jó egyezést mutatnak a WHO tanulmányokban mért szintekkel. A WHO által koordinált négy tanulmány éve alatt (1998-2007) a magyarországi anyatejminták PCB és PCDD/F koncentrációjában egy csökkenő időbeli trend volt megfigyelhető. Azonban az alacsony kezdeti koncentrációk mellett a csökkenés kisebb mértékű volt, a kiindulási értéknek csak felére apadt, míg a jobban szennyezett területeken, pl. Belgiumban az egynegyedére esett vissza a kontamináció mértéke. [110] Az észlelt alacsony koncentrációk talán magyarázatul szolgálhatnak arra, hogy vizsgálatunkban a POP koncentrációk miért korreláltak a paritással, és miért nem az anya életkorával. Jóllehet megfigyelték, hogy a paritás illetve a korábbi szoptatás időtartama negatívan, míg az anyai életkor pozitívan befolyásolja a PCB és PCDD/F kongenerek anyatejbeni koncentrációját. [213, 214]

Az átlagos zsírtartalom nőtt a szoptatási időszak alatt, mely megegyezik más tanulmányok eredményeivel [215, 216], de az általunk mért zsírtartalmak az első két mérési alkalommal (5. és 12. nap) magasabbak voltak, mint az ezen napoknál korábban közölt zsírtartalmak. [216] Ezzel szemben a 84. napon mért zsírtartalom megfelelt a hasonló korábbi tanulmányoknak. [215, 217] Habár az anyatejmintákat a reggeli

szoptatás alkalmával gyűjtöttük a zsírtartalom variabilitásának minimalizálása érdekében, ennek ellenére a zsírtartalom SD értéke magas volt és idővel nőtt. Korábban kimutatták, hogy az anyatej zsírtartalma nemcsak a nap során változik, hanem az egyes szoptatási alkalmakon belül is, sőt a két emlő között is lehet eltérés. [218–220] Más longitudinális tanulmányokhoz hasonlóan nem találtunk szignifikáns kapcsolatot a vizsgált szoptatási időszak különböző időpontjaiban mért zsírtartalmak között. [215, 216]

Vizsgálatunkban a kongenerek eloszlása az anyatejben nem változott a vizsgált szoptatási időszak során. Összességében egy erős korreláció volt megfigyelhető az 5., 12. és 84. napon gyűjtött anyatejminták organoklorid szennyezőanyag koncentrációi között. Hasonlóan erős korrelációt figyeltek meg PCB kongenerekkel kapcsolatban a szülést követő 4-5. és 14. napon gyűjtött mintákban. [216] Egy friss tanulmányban a PCDD/F és DL-PCB kongenerek megoszlási aránya, profilja hasonló maradt a tizenkét hónapon át havonta gyűjtött anyatejmintákban. [221]

Egy sokat idézett összefoglaló tanulmány a perzisztens zsírolékony vegyületek, úgymint PCB-k és PCDD/F-k longitudinális változását vizsgálta az anyatejben a szoptatás alatt. Viszonylag konzisztens eredményeket kaptak: az értékek csökkentek a szoptatás során, noha a különböző vizsgálatok eltérő eliminációs rátákról számoltak be. A szerzők arra a következtetésre jutottak, hogy a jelenleg elérhető információk nem elegendők a tisztulási mértékek kétséget kizáró kiszámolásához, ezért további vizsgálatok szükségesek a szoptatás alatti longitudinális változások felméréséhez. [222] Jelen vizsgálatunkban számos PCB kongener koncentráció csökkent a szoptatási időszak első három hónapja során. A csökkenés sokkal kifejezettebb volt (átlagosan 13%) az 5.–12. nap között, majd eléggé alacsonnyá vált (átlagosan 0.2%) a 12.–84. nap között. Yu és mtsai. [216] a PCB koncentrációk enyhe csökkenését figyelték meg a kolosztrum (4-5. nap) és az érett anyatejminták (14. nap) között, az össz PCB koncentráció csökkenése 11% volt. Ramos és mtsai. [223] 22 PCB kongener jelenlétét vizsgálta anyatejmintákban, az egyénektől a szoptatás teljes időtartama alatt 1-2 hetente vettek mintát. A PCB tartalom legnagyobb ingadozásait, változásait a szoptatás első heteiben mérték, majd a második hónap után sokkal állandóbb értékeket találtak. Egy friss kutatásban a PCB kongenerek eliminációs rátáját vizsgálták. 10 anyától, havonta gyűjtöttek anyatejmintákat a szoptatás teljes időtartama alatt (kb. két hét – tizenkét hónap). Lineáris kevert hatásmodellt használva szignifikáns, havonta 1.2-2.3%-os csökkenést állapítottak meg a legtöbb PCB kongener esetében. [224] Eredményeik

szoros egyezést mutatnak a Hooper és mtsai. [225] által közölt tisztulási rátákkal, akik kismértékű, de konzisztens csökkenést (4%) figyeltek meg az anyatej PCB-153 koncentrációjában a szoptatás 6 hónapja során. A fenti eredményekkel ellentétben Lakind és mtsai. [226], akik 10 anyánál a szülést követő 1., 2. és 3. hónapban mérték az anyatej POP szintjét, nem találtak következetes csökkenést a PCB tartalomban az szoptatás során.

Jelen vizsgálatunkban a PCDD/F koncentrációk csökkentek a szoptatási időszak első három hónapja során. A csökkenés sokkal kifejezettebb volt az 5.–12. nap között, majd tovább csökkent a 12.–84. nap között. A több klórt tartalmazó PCDD/F kongenerek gyorsabban eliminálódtak, mint a kevesebb klórt tartalmazók. A PCDF-k gyorsabban eliminálódtak, mint a PCDD vegyületek. Eredményeink jó összhangban vannak Beck és mtsai. [227] eredményeivel, akik tizenöt anyától gyűjtöttek anyatejmintákat a szülést követő 1., 6. és 12. héten azok PCDD/F tartalmának meghatározása érdekében. Vizsgálatunkban a több klórt tartalmazó kongenereknek magasabb eliminációs rátájuk volt, a csökkenés kifejezettebb volt az első hetekben, habár tanulmányukban a PCDD-k esetében gyorsabb csökkenést találtak, mint a PCDF-k esetében. Jelen vizsgálatunkban a szoptatás első három hónapja során a teljes PCDD/F-TEQ 19%-kal csökkent, míg Beck és mtsai. [227] vizsgálatában 25%-kal. Egy friss tanulmányban a szülést követő 5., 10. napon, majd havonta gyűjtöttek egy éven át anyatejmintát két anyától. A PCDD/F illetve DL-PCB koncentrációkból számított TEQ értékek szignifikánsan csökkentek: az 5. naphoz képest 18% illetve 7%-kal a 3. hónapra, valamint 43% illetve 40%-kal a 12. hónapra. [221] A fenti eredményekkel ellentétben Lakind és mtsai. [226], akik a szülést követően havonta 3 hónapon át mérték az anyatej POP szintjét, nem találtak következetes csökkenést a PCDD/F tartalomban.

Mivel a különböző POP kongenerek koncentrációi szorosan korreláltak, ezért egy minta tükrözheti az anyatej POP tartalmát az egész szoptatási időszak alatt. Habár a POP vegyületek a szoptatás teljes időtartama alatt megtalálhatók az anyatejben, érdemes átgondolni a mintavétel optimális időpontját az újszülöttek anyatej általi PCB és PCDD/F expozícióbecslése során. Javaslatunk szerint a legjobb a szoptatás elején gyűjteni a mintákat, lehetőleg a szülést követő 2.-3. héten. Az első két hét során nem ajánlott zavarni az anyákat, mivel egy korai időpontban történő megkeresés esetén vonakodhatnak részt venni a vizsgálatban. Ezen időszakban még nagy lehet az anyai aggodalmuk, hogy lesz-e elég anyatejük. Továbbá számos fontos immunológiailag fontos vegyületet tartalmaz az anyatej a szoptatás ezen korai időszakában, mely fontos a

veleszületett és szerzett immunrendszer fejlődésében. [228, 229] Másrészt egy késői anyatej donáció esetén is fellépet a résztvevői létszám csökkenésének problémája, mivel az idő előrehaladtával a kitartóan szoptató anyák aránya csökken. [230]

Vizsgálatunkban az újszülöttek testtömege majdnem megduplázódott a szoptatás időszak első 3 hónapjában. A napi anyatejfogyasztás növekedése nem a szoptatási gyakoriság emelkedésének, hanem az alkalmanként fogyasztott tejmenyiség növekedésének volt köszönhető. Az újszülöttek napi anyatejfogyasztása és testtömege erősen korrelált egymással minden vizsgálati napon. Korábbi vizsgálatokból ismert, hogy a g/nap vagy ml/nap mértékegységben kifejezett anyatejfogyasztás nagy eltérést mutat az újszülöttek között. Ez részben az anyatejfogyasztás és az újszülöttek testtömegének korrelációjának köszönhető [231], mivel a testtömegük jelentősen változik az első életév során. Ezért kockázatbecslés során a preferált mértékegység a testtömegre vonatkoztatott dózis. Ha csupán a napi anyatejfogyasztás átlagát osztanánk el a testtömegek átlagával az téves becsléshez is vezethetne. A becslés pontossága fokozható, ha azonos újszülöttektől, azonos mérései napon nyert anyatej fogyasztási és testtömeg adatokat használunk. Ezen kritériumnak megfelelő korábbi tanulmányok eredményeit felhasználva Arcus-Arth és mtsai. [217] megállapították, hogy az újszülöttek testtömegre vonatkoztatott napi anyatejfogyasztása az életkorral csökkent, és a legmagasabb az első hónapban volt. Azonban e tanulmányok nem longitudinális vizsgálatok voltak, azaz az egyes mérési időpontokban nem azonos újszülöttek vettek részt. Jelen longitudinális vizsgálatunkban az újszülöttek testtömegre vonatkoztatott napi anyatejfogyasztása az első hónap végén volt a legmagasabb.

Bár a magyar anyatejminták POP tartalma európai összehasonlításban viszonylag alacsonynak tekinthető, azonban a szoptatási időszak első 3 hónapjában az újszülöttek anyatej általi POP expozíciója még így is jelentősen meghaladta a JECFA és a SCF szervezetek által nemrégiben felülvizsgált és újonnan megállapított tolerálható napi bevitelt, azaz a 2 pg-TEQ/ttkg-t. [108, 109]

Eredményeink alapján elmondható, hogy magyar anyatejmintákban toxikus POP vegyületek konzisztens jelenlétét mutattuk ki, és hogy fokozott figyelemmel kell lennünk ezen káros szennyezőanyagok anyatejben való jelenlétére, mivel az újszülöttek nagy mennyiségű POP expozíciónak lehetnek kitéve a szoptatási időszak alatt.

4. MIF jelenlétének vizsgálata anyatejmintákban

4.1. Bevezetés és célkitűzés

Az anyatej egy olyan komplex biológiai folyadék, mely optimális táplálékul szolgál az újszülöttek számára. Az újszülött fejlődésére, az immunrendszer érésére kifejtett kedvező hatásai [232], valamint pszichológiai, gazdasági és gyakorlati előnyei széles körben ismertek, ezért a WHO kizárólagos szoptatást ajánl a csecsemő hat hónapos koráig. [233]

A laktáló emlő kialakulása nagyrészt a terhesség alatt az emlő mirigyszövetére ható erős ösztrogén (és egyéb placentális eredetű) hormonhatás következtében lezajló intenzív fiziológiás mirigysejt-proliferációt jelenti. Maga a laktáció már nem ösztrogénfüggő, viszont ösztrogén kezelés képes azt elnyomni. [234] Jelenleg nem ismert, hogy ezekben a folyamatokban a MIF citokinnek van-e közvetlen szerepe. Az emlő mirigysejtjeinek rosszindulatú burjánzása, azaz az emlőrákok többsége szintén ösztrogén érzékeny mivel a tumor sejtekben ER-ok expresszálódnak. [235, 236] Emelkedett MIF szinteket mutattak ki emlő tumorban. [237, 238] Verjans és mtsai. [239] egy átfogó kutatásban vizsgálták a MIF szerepét az emlőrák kialakulásában. Pozitív korrelációt figyeltek meg a tumor sejtek MIF expressziója és az ER expresszió között.

Az anyatej számos bioaktív vegyületet tartalmaz, köztük hormonokat, növekedési faktorokat és a veleszületett és az adaptív immunvédelem mediátorait. [240, 241] Számos gyulladáskeltő és gyulladásgátló citokint mutattak ki olyan mennyiségekben a humán anyatejben, mely alapján valószínűsíthető élettani jelentőségük, és a detektált mediátorok listája napjainkban is intenzíven növekszik. [229, 241] Ezen anyagok védelmet biztosíthatnak kiegészítve az újszülött veleszületett immunrendszerét, továbbá módosíthatják annak érési folyamatát.

A gyulladáskeltő MIF citokint számos humán sejtfeleség termeli illetve szekretálja, jelenlétét már kimutatták humán anyatejmintákban is. [242] Azonban koncentrációjának változását a szoptatási időszak különböző fázisaiban eddig még nem vizsgálták, jóllehet jelentősége lehet az újszülött immunkompetenciájának kialakulásában. Ezért célul tűztük ki a humán anyatej MIF tartalmának időbeli változásának vizsgálatát.

4.2. Módszerek

Résztvevők:

A vizsgálatokat a PTE Regionális Kutatás Etikai Bizottság és az ETT TUKÉB szabályainak megfelelően, azok engedélyével végeztük, melyek mindenben megfelelnek az Orvos-Világszövetség Helsinkai deklarációjának. Vizsgálatunkba olyan egészséges, szoptató édesanyákat vontunk be, akik érett, egészséges újszülötteket hoztak világra a Baranya Megyei Kórház Szülészeti Osztályán 2007-ben. A résztvevők általános jellemzőit az 5. táblázat tartalmazza.

	átlag \pm SD
Anyai életkor (év)	27.5 \pm 4.4
Anyai BMI terhesség előtt (kg/m ²)	22.9 \pm 4.8
Anyai BMI szülés előtt (kg/m ²)	28.2 \pm 4.1
Terhességi hét (hét)	39.2 \pm 1.3
Születési súly (g)	3257 \pm 525
Születési hossz (cm)	49.9 \pm 2.7
Nem (fiú/lány)	10/11 (48%/52%)
Paritás (első/második gyermek)	13/8 (62%/38%)

5. táblázat. A vizsgálatban résztvevő anyák és újszülöttjeik általános jellemzői.

Vizsgálati protokoll:

21 résztvevőtől gyűjtöttünk 25-30 ml anyatejmintát a szoptatási időszak első három hónapja során, a szülést követő 5., 12., és 84. napon (colostrum, átmeneti tej, érett női tej). A mintákat a reggeli első szoptatás során gyűjtöttük – elkerülendő az esetleges diurnális változásból eredő eltéréseket –, és a vizsgálatok elvégzéséig -20°C-on tároltuk.

MIF koncentráció mérése:

Centrifugálással (13000 rpm, 5 perc) az anyatejmintákat három fázisra választottuk szét: a felülúszó lipidrétegre, a közbenső vizes fázisra és a sejteket tartalmazó üledékrétegre. Ezt követően a vizes fázis fehérjetartalmát Bradford módszerrel határoztuk meg, a MIF tartalmát pedig ELISA teszttel detektáltuk.

Statisztikai kiértékelés:

Az eredményeket átlag \pm SD formában adtuk meg. A kiértékelés során SPSS statisztikai programot használtunk. A minták fehérjetartalma normális eloszlást mutatott, ezért az időbeni változás, trend kiértékeléséhez ANOVA repeated measures tesztet alkalmaztunk. Az egyes napokon mért értékek további összehasonlításához páros t-próbát illetve Pearson korrelációt alkalmaztunk. A MIF koncentráció (ng MIF/ml) és a fehérjetartalomra vonatkoztatott MIF értékek (ng MIF/mg fehérje) lognormális eloszlást mutattak, így Friedman tesztet alkalmaztunk az időbeni változás, trend kiértékeléséhez. Az egyes napokon mért értékek további összehasonlításához Wilcoxon tesztet illetve Spearman korrelációt alkalmaztunk. Többszörös lineáris regresszió analízis segítségével vizsgáltuk a MIF értékek illetve a fehérjetartalom összefüggését az anyák és újszülöttjeik olyan jellemzőivel, mint anyai életkor, anyai BMI terhesség előtt illetve szülés előtt, terhességi hét szüléskor, szülés módja, valamint az újszülött neme, paritása, születési súlya. A statisztikai kiértékelés során $p < 0.05$ szignifikancia szintet alkalmaztunk. A páros-t teszt és a Wilcoxon teszt esetében Bonferroni korrekció alkalmazásával határoztuk meg a szignifikancia szintet.

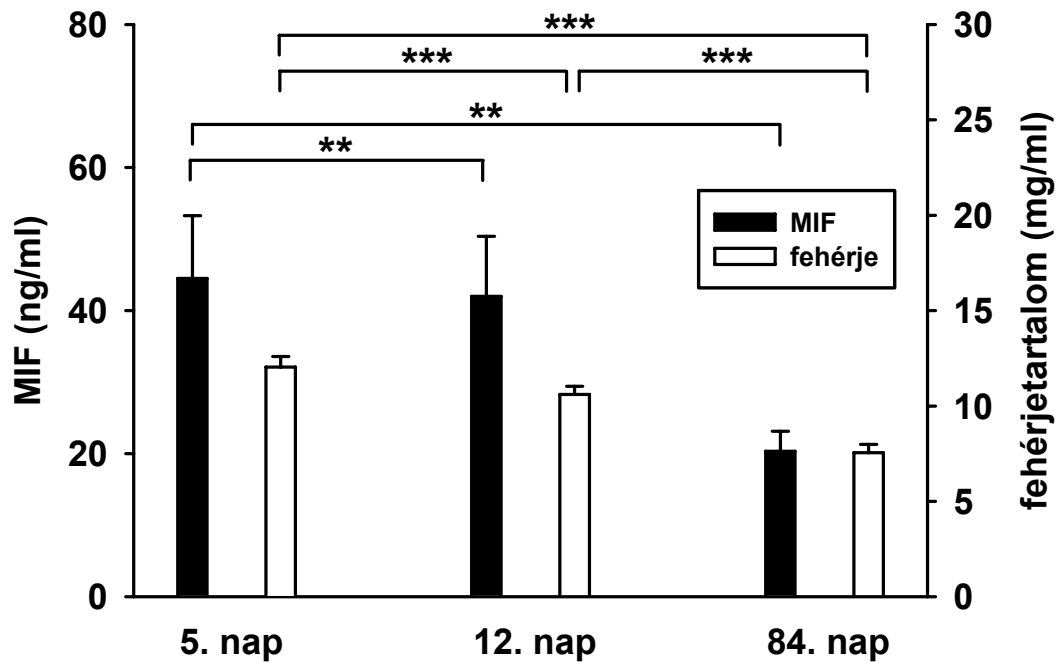
4.3. Eredmények

A gyűjtött anyatejminták mindegyikében kimutatható volt a MIF citokin jelenléte. A szoptatás során a MIF anyatejbeli szintje minden résztvevő esetében hasonló időbeli trendet követett. A különböző időpontokban gyűjtött minták MIF koncentrációi szignifikánsan korreláltak egymással (5.–12. nap: $p < 0.001$; 5.–84. nap: $p < 0.05$; 12.–84. nap: $p < 0.05$).

A MIF értékekben egy szignifikánsan csökkenő időbeli trend volt megfigyelhető a szoptatás első három hónapja során ($p < 0.001$; 5. nap: 44.5 ± 40.3 ng/ml; 12. nap: 42.0 ± 38.5 ng/ml; 84. nap: 20.3 ± 12.9 ng/ml). Ezen belül a 84. napon gyűjtött anyatejminták MIF szintje szignifikánsan alacsonyabb volt, mint az 5. vagy a 12. napon gyűjtöttekben (5.–84. nap: $p < 0.001$; 12.–84. nap: $p < 0.01$). (13. ábra)

Az anyatejminták fehérjetartalma szignifikánsan csökkent a szoptatás során ($p < 0.001$; 5. nap: 12.0 ± 2.6 mg/ml; 12. nap: 10.6 ± 1.9 mg/ml; 84. nap: 7.6 ± 2.0 mg/ml). A különböző időpontokban gyűjtött minták fehérjetartalmai szignifikánsan korreláltak egymással (5.–12. nap: $p < 0.001$; 5.–84. nap: $p < 0.05$; 12.–84. nap: $p < 0.05$). A csökkenés időbeli trendje egyenletes volt: a 12. és a 84. napon a fehérjetartalmak szignifikánsan

alacsonyabbak volt, mint az 5. napon, valamint a 84. nap gyűjtött minták fehérjeszintje kisebb volt, mint a 12. napon gyűjtött mintáké (5.–12. nap: $p < 0.001$; 5.–84. nap: $p < 0.001$; 12.–84. nap: $p < 0.001$). (13. ábra)



13. ábra. Az anyatej MIF koncentrációjának és fehérjetartalmának változása a szoptatási időszak során. (átlag \pm SEM) (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$)

A MIF szintek és a minták fehérjetartalmai nem korreláltak egymással (5. nap: $p = 0.336$; 12. nap: $p = 0.668$; 84. nap: $p = 0.695$). A fehérjetartalomra vonatkoztatott citokin értékek nem mutattak szignifikáns változást a szoptatás első három hónapja során ($p = 0.368$; 5. nap: 3.7 ± 3.2 ng/mg; 12. nap: 4.0 ± 3.2 ng/mg; 84. nap: 3.3 ± 3.3 ng/mg).

Az anyatej MIF szintek és a vizsgált anyai illetve újszülött jellemzők között nem találtunk szignifikáns összefüggést. Hasonlóan, a fehérjetartalmat nem befolyásolták a résztvevők vizsgált paraméterei.

4.4. Eredmények megbeszélése és következtetés

Az anyatej immunológiailag aktív vegyületekben gazdag, természetes táplálékul szolgál az újszülöttek számára. Éretlen és fejlődésben lévő immunrendszerük igen fogékonyá teszi őket a fertőzésekre életük ezen korai időszakában. Azonban azon citokinek többsége, melyek csökkent mennyiségben vannak jelen az újszülöttekben, jelentékeny mennyiségben megtalálhatók az anyatejben. [229] Az orálisan bejuttatott citokinek feltehetően a szájüreg mucosa és nyirok sejtjeire, valamint a bélrendszer nyirokszövet rendszerére hatnak és elősegítik az immunrendszer érését. [243]

Vizsgálatunk során jelentékeny mennyiségű MIF jelenlétét mutattuk ki a szoptatás első három hónapja során gyűjtött anyatejminták vizes fázisában. Sőt, a MIF koncentrációk kb. egy nagyságrenddel nagyobbak voltak, mint más anyatejben talált citokin koncentrációk. [244]

Az általunk mért MIF koncentrációk megegyeztek az irodalomból ismert adatokkal. Nevezetesen Magi és mtsai. [242] mutatták ki először MIF jelenlétét a szülést követő 5. napon gyűjtött humán anyatejmintákban. Kutatásaik alapján a MIF amellet, hogy megtalálható az anyatej vizes fázisában, megtalálható a tej lipidrétégeiben is.

Az anyatejminták vizes fázisának fehérjetartalma egyenletesen csökkent a szoptatás első három hónapja során. Eredményeink összhangban vannak az irodalomból ismert adatokkal, az anyatej csökkenő fehérjetartalmát írták le a szoptatás előrehaladtával, mely csökkenés kifejezettebb volt a szoptatás első hónapjában. [245, 246]

Korábbi kutatások immunológiailag aktív vegyületek csökkenő időbeli trendjét mutatták ki a szoptatás alatt. [245, 247, 248] Vizsgálatunkban az anyatejminták vizes fázisának MIF tartalma csökkenést mutatott a szoptatás első három hónapja során.

Eredményeink alapján elmondható, hogy a MIF nagy mennyiségben van jelen az anyatejben, különösen a szoptatás első hónapjában. Jelenléte szerepet játszhat az anya és újszülöttje közti komplex immunológiai interakciókban, melyek jelentőséggel bírhatnak a fertőzések elleni védekezésben ezen érzékeny és sebezhető időszakban.

5. Új eredmények összefoglalása

1. Klinikai tanulmányunkban a polifenolokban gazdag cikóriakávé fogyasztás hatásait vizsgáltuk egészséges önkéntesek bevonásával.

- Egy hetes cikóriakávé fogyasztás hatása a trombocita aggregációra függ az alkalmazott induktortól.
- Egy hetes cikóriakávé fogyasztás szignifikánsan javította a hemorheológiai paramétereket: a plazma és teljes vér viszkozitást, valamint a vörösvérsejt deformabilitást.
- Egy hetes cikóriakávé fogyasztás szignifikánsan és számottevően csökkentette a szérum MIF szintet. Elsőként mutattuk ki, hogy polifenolokban gazdag táplálék fogyasztása kedvező hatással van a szérum MIF szintre.

2. Klinikai vizsgálatunkban PCB és PCDD/F kongenerek jelenlétét és szoptatási időszak alatti változását követtük magyar anyatejmintákban.

- A miénk az első olyan vizsgálat, mely nem összeöntött („pool”-olt), hanem egyéni magyar anyatejminták PCB és PCDD/F tartalmáról szolgáltat megbízható adatokat.
- Számos PCB és PCDD/F kongener koncentrációja szignifikánsan csökkent a szoptatási időszak első három hónapja során. A csökkenés sokkal kifejezettebb volt az 5.–12. nap között. Ezen eredményeink hozzájárulhatnak a POP kongenerek eliminációs rátáinak pontosabb meghatározásához.
- A magyar anyatejminták POP tartalma európai összehasonlításban viszonylag alacsonynak bizonyult.
- Az újszülöttek testtömegre vonatkoztatott napi anyatejfogyasztása az első hónap végén volt a legmagasabb. Kutatásunk hiányt pótló, mivel longitudinális vizsgálatunkban a szoptatási időszak első időszakában mértük mind az újszülöttek napi anyatejfogyasztását, mind testtömegét. Ezáltal vizsgálatunk a jövőben lehetőséget biztosít pontosabb expozícióbecslések készítésére.
- A szoptatási időszak első három hónapjában az újszülöttek anyatej általi POP expozíciója végig jelentősen meghaladta a JECFA és a SCF szervezetek által megállapított tolerálható napi bevitelt.

3. Kutatásunkban MIF citokin jelenlétét és szoptatási időszak alatti változását vizsgáltuk anyatejmintákban.

- Elsőként mutattuk ki, hogy az anyatejminták vizes fázisának MIF tartalma szignifikánsan csökkent a szoptatási időszak első három hónapja során.

6. Köszönetnyilvánítás

Őszinte hálával és köszönettel tartozom témavezetőmnek Dr. Garai Jánosnak, aki lehetőséget adott kutatási munkám elvégzéséhez, bevezetett a kísérletezés rejtelseibe és lehetőséget biztosított külföldi tanulmányutakon való részvételre. Köszönöm Dr. Emilio Benfenati Professzor Úr, Helen Håkansson Professzor Asszony és Marika Berglund támogatását és iránymutatását a külföldön végrehajtott tanulmányok során. Nagyon köszönöm Dr. Székely Miklós és Dr. Szelényi Zoltán Professzor Urak segítő támogatását és biztatását. Külön köszönet illeti Dr. Szekeres-Solymár Margitot, kinek önzetlen baráti támogatására mindig bizton számíthattam. Köszönöm Dr. Balaskó Márta, Dr. Soós Szilvia és Dr. Pétervári Erika tanácsait és baráti segítségét. Hálával tartozom Girán Juditnak és Szommer Zsuzsanna Dalmának a kísérletek kivitelezésében való segítségért, továbbá a Kórélettani és Gerontológiai Intézet valamennyi munkatársának lelkes támogatásukért.

7. Rövidítések jegyzéke

ADP	adenozin difoszfát
AhR	aril-hidrokarbon receptor
AP-1	aktivátor protein-1
ARNT	AhR nukleáris transzlokátor
BMI	body mass index (testtömegindex)
COX-2	ciklo-oxigenáz-2
COMT	katekol-O-metiltranszferáz
DDT	diklór-difenil-triklóretán
DL-PCB	dioxin-like PCB (dioxinszerű PCB)
EDC	endocrine disruptor chemical (endokrin diszruptor vegyület)
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay (enzim kapcsolt immunszorbens teszt)
ER	ösztrogén receptor
ERK	extracelluláris szignál-regulált kináz
ETT TUKEB	Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottság
HCH	hexaklór-ciklohexán
IARC	International Agency for Research on Cancer (Nemzetközi Rákkutató Központ)
IPCS	International Programme on Chemical Safety (Nemzetközi Kémiai Biztonsági Program)
IFN	interferon
IL	interleukin
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry (Nemzetközi Elméleti és Alkalmazott Kémiai Egyesület)
Jab-1	Jun activation domain-binding protein-1 (Jun-aktivációs domén kötő fehérje-1)
JECFA	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (Közös FAO/WHO Élelmiszer Adalékanyag Szakértői Bizottság)

LOD	kimutatási határ (limit of detection)
LORCA	Laser-assisted Optical Rotational Cell Analyzer
LPS	lipopoliszacharid
MAPK	mitogén-aktivált protein kináz
MCF-7	humán emlő adenocarcinoma sejtvonal
MHC	major histocompatibility complex (fő hisztokompatibilitási komplex)
MIF	makrofág migráció inhibitor faktor
NDL-PCB	non-dioxin-like PCB (nem dioxinszerű PCB)
PCB	poliklórozott bifenil
PCDD	poliklórozott dibenzo-p-dioxin
PCDF	poliklórozott dibenzofurán
PGE ₂	prostaglandin E ₂
PKA	protein kináz A
PLA ₂	foszfolipáz A ₂
POP	persistent organic pollutant (perzisztens organikus pollutáns)
SERM	szelektív ösztrogén receptor modulátor
SCF	Scientific Committee on Food (Európai Unió Élelmiszerügyi Tudományos Bizottsága)
SIRS	szisztémás inflammatorikus reakció szindróma
TCDD	2,3,7,8-tetraklorodibenzo-p-dioxin
TDI	tolerable daily intake (tolerálható napi bevitel)
TEF	toxic equivalency factor (toxicitási egyenérték faktor)
TEQ	toxic equivalent (toxikus egyenérték)
TLR-4	Toll-like receptor 4
TNF	tumor nekrozis faktor
TSST-1	toxikus shock szindróma toxin-1
US EPA	United States Environmental Protection Agency (Amerikai Környezetvédelmi Ügynökség)
WHO	World Health Organization (Egészségügyi Világszervezet)

8. Függelékek

1. függelék. Az anyatej PCB és PCDD/F kongener koncentrációi zsírtartalomra vonatkoztatva (pg/g zsír) illetve a WHO által ajánlott TEF faktorok segítségével toxikus egyenérték formában (pg WHO-TEQ/g zsír) kifejezve. A mintákat magyar anyáktól gyűjtöttük a szülést követő 5., 12. és 84. napon. Egyes kongener koncentrációk esetén csökkenő időbeli trend volt megfigyelhető. (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001)

	5. nap		12. nap		84. nap	
	átlag	SD	átlag	SD	átlag	SD
PCB-28	1222.60	1343.62	994.74	950.96	1004.92	798.44
PCB-52	1164.31	2774.19	778.66	889.80	784.55	937.03
PCB-101	2656.42	4408.52	2012.88	2969.20	2053.27	2978.45
PCB-138 *	8818.42	9028.68	7275.74	5675.98	7278.98	6256.62
PCB-153	12201.01	11416.84	10513.24	8232.01	10556.90	9475.80
PCB-170 **	2017.96	2499.24	1892.55	2260.31	1889.16	2613.03
PCB-180	3962.27	4832.32	3574.07	4052.94	3658.33	4960.87
Teljes NDL-PCB^{a, b *}	32042.98	29757.80	27041.88	20242.25	27226.10	23488.52
PCB-77	32.80	32.71	29.61	16.31	27.47	18.43
PCB-81	1.88	1.72	1.98	1.97	1.87	1.79
PCB-126 *	5.39	6.04	4.47	6.31	4.16	6.25
PCB-169 *	9.83	15.57	7.24	12.23	8.57	12.90
Teljes non-orto DL-PCB^c	49.90	44.45	43.29	25.78	42.07	29.91
Teljes non-orto DL-PCB TEQ^c	0.84	0.72	0.67	0.72	0.68	0.72
PCB-105	483.83	438.26	477.25	383.90	472.99	468.87
PCB-114 *	74.85	57.57	71.10	54.28	73.13	71.75
PCB-118 *	2049.24	1720.76	1840.21	1660.09	1808.29	2015.89
PCB-123	27.86	27.00	28.01	21.96	29.04	25.74
PCB-156 *	648.03	675.85	591.57	624.18	610.30	765.10
PCB-157 *	120.91	113.67	111.02	102.12	108.40	119.23
PCB-167 **	245.47	277.85	221.98	249.56	214.42	292.94
PCB-189 **	76.67	95.47	64.09	78.92	65.07	89.59
Teljes mono-orto DL-PCB^{d *}	3726.87	3263.21	3405.22	3120.25	3381.63	3791.59
Teljes mono-orto DL-PCB TEQ^{d *}	0.11	0.10	0.10	0.09	0.10	0.11

Teljes DL-PCB^{e*}	3776.77	3283.19	3448.52	3127.29	3423.70	3806.59
Teljes DL-PCB TEQ^{e*}	0.95	0.79	0.77	0.79	0.78	0.81
Teljes PCB^{f*}	35819.75	32841.25	30490.39	22821.10	30649.80	26811.60
2,3,7,8-TCDD *	0.35	0.14	0.31	0.16	0.29	0.18
1,2,3,7,8-PeCDD *	0.70	0.62	0.68	0.63	0.55	0.37
1,2,3,4,7,8-HeCDD *	0.88	0.62	0.76	0.58	0.65	0.58
1,2,3,6,7,8-HeCDD *	2.66	3.80	2.65	3.54	2.00	2.74
1,2,3,7,8,9-HeCDD	0.99	0.78	0.81	0.68	0.87	1.04
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	2.91	8.17	3.14	8.11	2.22	4.82
OCDD *	44.47	35.38	32.21	32.55	32.22	28.72
2,3,7,8-TCDF	0.31	0.13	0.28	0.17	0.27	0.20
1,2,3,7,8-PeCDF	0.36	0.14	0.32	0.17	0.31	0.19
2,3,4,7,8-PeCDF	0.42	0.36	0.37	0.29	0.36	0.32
1,2,3,4,7,8-HeCDF	0.70	0.60	0.60	0.54	0.59	0.54
1,2,3,6,7,8-HeCDF	0.59	0.37	0.56	0.39	0.54	0.49
2,3,4,6,7,8-HeCDF	0.62	0.37	0.57	0.41	0.58	0.53
1,2,3,7,8,9-HeCDF	0.75	0.47	0.67	0.54	0.68	0.68
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	2.25	2.81	1.68	2.01	1.85	2.63
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0.37	0.18	0.32	0.20	0.30	0.19
OCDF *	2.17	4.51	0.91	1.55	0.83	1.30
Teljes PCDD/F^{**}	61.50	45.85	46.84	43.17	45.08	35.71
Teljes PCDD/F TEQ^{**}	2.00	1.23	1.86	1.18	1.62	0.98
Teljes TEQ^{g**}	2.95	1.59	2.63	1.52	2.40	1.45

^a NDL-PCB kongenerek nem rendelkeznek toxicitási egyenérték faktorról (TEF).

^b NDL-PCB kongenerek: 28, 52, 101, 138, 153, 170 és 180.

^c Non-orto DL-PCB kongenerek: 81, 77, 126 és 169.

^d Mono-orto DL-PCB kongenerek: 105, 114, 118, 123, 156, 157, 167 és 189.

^e Teljes DL-PCB a non-orto DL-PCB és a mono-orto DL-PCB-ket foglalja magába.

^f Teljes PCB a DL-PCB-ket és a NDL-PCB-ket foglalja magába.

^g Teljes TEQ a teljes PCDD/F TEQ-et és a teljes DL-PCB TEQ-et foglalja magába.

9. Irodalomjegyzék

1. Bennetts HW, Underwood EJ, Shier FL. A specific breeding problem of sheep on subterranean clover pastures in Western Australia. *Aust Vet J* 1946, 22:2-12.
2. IPCS 2002. Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors. Eds. Damstra T, Barlow S, Bergman A, Kavlock R, Van Der Kraak G. (WHO/PCS/EDC/02.2.) World Health Organization, Geneva, Switzerland.
3. Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon JP, Giudice LC, Hauser R, Prins GS, Soto AM, Zoeller RT, Gore AC. Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocr Rev* 2009, 30:293-342.
4. Adams NR. Detection of the effects of phytoestrogens on sheep and cattle. *J Anim Sci* 1995, 73:1509-1515.
5. Drane HM, Wrathall AE, Patterson DS, Hebert CN. Possible oestrogenic effects of feeding soyameal to prepubertal gilts. *Br Vet J* 1981, 137:283-288.
6. Wright PA. Infertility in rabbits induced by feeding Ladino clover. *Proc Soc Exp Biol Med* 1960, 105:428-430.
7. Watanabe S, Yamaguchi M, Sobue T, Takahashi T, Miura T, Arai Y, Mazur W, Wähälä K, Adlercreutz H. Pharmacokinetics of soybean isoflavones in plasma, urine and feces of men after ingestion of 60g baked soybean powder (kinako). *J Nutr* 1998, 128:1710-1715.
8. Manach C, Donovan JL. Pharmacokinetics and metabolism of dietary flavonoids in humans. *Free Radic Res* 2004, 38:771-785.
9. Zhang Y, Wang GJ, Song TT, Murphy PA, Hendrich S. Urinary disposition of the soybean isoflavones daidzein, genistein and glycitein differs among humans with moderate fecal isoflavone degradation activity. *J Nutr* 1999, 129:957-962.
10. Hughes CL Jr. Phytochemical mimicry of reproductive hormones and modulation of herbivore fertility by phytoestrogens. *Environ Health Perspect* 1998, 78:171-174.
11. Russell GB, Singh P, Fenemore PG. Insect-control chemicals from plants. III. Toxic lignans from *Libocedrus bidwillii*. *Aust J Biol Sci* 1976, 29:99-103.
12. Shimada N, Akashi T, Aoki T, Ayabe S. Induction of isoflavonoid pathway in the model legume *Lotus japonicus*: molecular characterization of enzymes involved in phytoalexin biosynthesis. *Plant Sci* 2000, 160:37-47.

13. Mathesius U. Flavonoids induced in cells undergoing nodule organogenesis in white clover are regulators of auxin breakdown by peroxidase. *J Exp Bot* 2001, 52:419-426.
14. Peck MC, Fisher RF, Long SR. Diverse flavonoids stimulate NodD1 binding to nod gene promoters in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* 2006, 188:5417-5427.
15. Dean PDG, Exley D, Goodwin TW. Steroid oestrogens in plants: re-estimation of oestrone in pomegranate seeds. *Phytochemistry* 1971, 10:2215-2216.
16. Adlercreutz H, Mazur W. Phyto-oestrogens and Western diseases. *Ann Med* 1997, 29:95-120.
17. Reinli K, Block G. Phytoestrogen content of foods – a compendium of literature values. *Nutr Cancer* 1996, 26:123-148.
18. Mazur WM, Duke JA, Wähälä K, Rasku S, Adlercreutz H. Isoflavonoids and lignans in legumes: Nutritional and health aspects in humans. *J Nutr Biochem* 1998, 9:193-200.
19. Mazur WM, Adlercreutz H. Naturally occurring estrogens in food. *Pure Appl Chem* 1998, 70:1759-1776.
20. Mazur WM, Wähälä K, Rasku S, Salakka A, Hase T, Adlercreutz H. Lignan and isoflavonoid concentrations in tea and coffee. *Br J Nutr* 1998, 79:37-45.
21. Lieberman S. Are the differences between estradiol and other estrogens, naturally occurring or synthetic, merely semantical? *J Clin Endocrinol Metab* 1996, 81:850-851.
22. Hughes C. Are the differences between estradiol and other estrogens merely semantical? *J Clin Endocrinol Metab* 1996, 81:2405.
23. Ise R, Han D, Takahashi Y, Terasaka S, Inoue A, Tanji M, Kiyama R. Expression profiling of the estrogen responsive genes in response to phytoestrogens using a customized DNA microarray. *FEBS Lett* 2005, 579:1732-1740.
24. Naciff JM, Jump ML, Torontali SM, Carr GJ, Tiesman JP, Overmann GJ, Daston GP. Gene expression profile induced by 17alpha-ethynyl estradiol, bisphenol A, and genistein in the developing female reproductive system of the rat. *Toxicol Sci* 2002, 68:184-199.
25. Hwang CS, Kwak HS, Lim HJ, Lee SH, Kang YS, Choe TB, Hur HG, Han KO. Isoflavone metabolites and their in vitro dual functions: They can act as an estrogenic agonist or antagonist depending on the estrogen concentration. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2006, 101:246-253.

26. Bowers JL, Tyulmenkov VV, Jernigan SC, Klinge CM. Resveratrol acts as a mixed agonist/antagonist for estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 2000, 141:3657-3667.
27. Jordan VC. Selective estrogen receptor modulation: a personal perspective. *Cancer Res* 2001, 61:5683-5687.
28. Brzezinski A, Debi A. Phytoestrogens: the “natural” selective estrogen receptor modulators? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1999, 85:47-51.
29. Green S, Walter P, Kumar V, Krust A, Bornert JM, Argos P, Chambon P. Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature* 1986, 320:134-139.
30. Greene GL, Gilna P, Waterfield M, Baker A, Hort Y, Shine J. Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science* 1986, 231:1150-1154.
31. Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, 93:5925-5930.
32. Dai SY, Burris TP, Dodge JA, Montrose-Rafizadeh C, Wang Y, Pascal BD, Chalmers MJ, Griffin PR. Unique ligand binding patterns between estrogen receptor alpha and beta revealed by hydrogen-deuterium exchange. *Biochemistry* 2009, 48:9668-9676.
33. Coffey DS. Similarities of prostate and breast cancer: Evolution, diet, and estrogens. *Urology*, 2001, 57:31-38.
34. Ramos S. Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention. *J Nutr Biochem* 2007, 18:427-442.
35. Siow RC, Li FY, Rowlands DJ, de Winter P, Mann GE. Cardiovascular targets for estrogens and phytoestrogens: Transcriptional regulation of nitric oxide synthase and antioxidant defense genes. *Free Radic Biol Med* 2007, 42:909-925.
36. Turner JV, Agatonovic-Kustrin S, Glass BD. Molecular aspects of phytoestrogen selective binding at estrogen receptors. *J Pharm Sci* 2007, 96:1879-1885.
37. Medjakovic S, Jungbauer A. Red clover isoflavones biochanin A and formononetin are potent ligands of the human aryl hydrocarbon receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2008, 108:171-177.
38. Watson CS, Bulayeva NN, Wozniak AL, Finnerty CC. Signaling from the membrane via membrane estrogen receptor-alpha: Estrogens, xenoestrogens, and

- phytoestrogens. *Steroids* 2005, 70:364-3671.
39. Watson CS, Alyea RA, Jeng YJ, Kochukov MY. Nongenomic actions of low concentration estrogens and xenoestrogens on multiple tissues. *Mol Cell Endocrinol* 2007, 274:1-7.
 40. Belcher SM, Zsarnovszky A. Estrogenic actions in the brain: estrogen, phytoestrogens, and rapid intracellular signaling mechanisms. *J Pharmacol Exp Ther* 2001, 299:408-414.
 41. Krazeisen A, Breitling R, Möller G, Adamski J. Phytoestrogens inhibit human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 5. *Mol Cell Endocrinol* 2001, 171:151-162.
 42. Lu LJ, Cree M, Josyula S, Nagamani M, Grady JJ, Anderson KE. Increased urinary excretion of 2-hydroxyestrone but not 16alpha-hydroxyestrone in premenopausal women during a soya diet containing isoflavones. *Cancer Res* 2000, 60:1299-1305.
 43. Pietta PG. Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod* 2000, 63:1035-1042.
 44. Castillo C, Salazar V, Ariznavarreta C, Vara E, Tresguerres JA. Effect of isoflavone administration on age-related hepatocyte changes in old ovariectomized female Wistar rats. *Phytomedicine* 2006, 13:468-476.
 45. Prokai L, Prokai-Tatrai K, Perjesi P, Zharikova AD, Perez EJ, Liu R, Simpkins JW. Quinol-based cyclic antioxidant mechanisms in estrogen neuroprotection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003, 100:11741-11746.
 46. Prokai-Tatrai K, Perjesi P, Rivera-Portalatin NM, Simpkins JW, Prokai L. Mechanistic investigations on the antioxidant action of a neuroprotective estrogen derivative. *Steroids* 2008, 73:280-288.
 47. Hwang J, Sevanian A, Hodis HN, Ursini F. Synergistic inhibition of LDL oxidation by phytoestrogens and ascorbic acid. *Free Radic Biol Med* 2000, 29:79-89.
 48. Ambra R, Rimbach G, de Pascual Teresa S, Fuchs D, Wenzel U, Daniel H, Virgili F. Genistein affects the expression of genes involved in blood pressure regulation and angiogenesis in primary human endothelial cells. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2006, 16:35-43.
 49. Peterson G. Evaluation of the biochemical targets of genistein in tumor cells. *J Nutr* 1995, 125:784S-789S.
 50. Mazur W, Adlercreutz H. Overview of naturally occurring endocrine-active

- substances in the human diet in relation to human health. *Nutrition* 2000, 16:654-658.
51. Innocenti G, Vegeto E, Dall'Acqua S, Ciana P, Giorgetti M, Agradi E, Sozzi A, Fico G, Tomè F. In vitro estrogenic activity of *Achillea millefolium* L. *Phytomedicine* 2007, 14:147-152.
 52. Zhu BT, Conney AH. Is 2-methoxyestradiol an endogenous estrogen metabolite that inhibits mammary carcinogenesis? *Cancer Res* 1998, 58:2269-2277.
 53. Pribluda VS, Gubish ER Jr, Lavallee TM, Treston A, Swartz GM, Green SJ. 2-Methoxyestradiol: an endogenous antiangiogenic and antiproliferative drug candidate. *Cancer Metastasis Rev* 2000, 19:173-179.
 54. Zhu BT, Liehr JG. Inhibition of catechol O-methyltransferase-catalyzed O-methylation of 2- and 4-hydroxyestradiol by quercetin. Possible role in estradiol-induced tumorigenesis. *J Biol Chem* 1996, 271:1357-1363.
 55. Nagai M, Conney AH, Zhu BT. Strong inhibitory effects of common tea catechins and bioflavonoids on the O-methylation of catechol estrogens catalyzed by human liver cytosolic catechol-O-methyltransferase. *Drug Metab Dispos* 2004, 32:497-504.
 56. Zhu BT, Liehr JG. Quercetin increases the severity of estradiol-induced tumorigenesis in hamster kidney. *Toxicol Appl Pharmacol* 1994, 125:149-158.
 57. Zhu BT, Wang P, Nagai M, Wen Y, Bai HW. Inhibition of human catechol-O-methyltransferase (COMT)-mediated O-methylation of catechol estrogens by major polyphenolic components present in coffee. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2009, 113:65-74.
 58. Zych M, Folwarczna J, Trzeciak HI. Natural phenolic acids may increase serum estradiol level in ovariectomized rats. *Acta Biochim Pol* 2009, 56:503-507.
 59. Ninfali P, Mea G, Giorgini S, Rocchi M, Bacchiocca M. Antioxidant capacity of vegetables, spices and dressings relevant to nutrition. *Br J Nutr* 2005, 93:257-266.
 60. Norata GD, Marchesi P, Passamonti S, Pirillo A, Violi F, Catapano AL. Anti-inflammatory and anti-atherogenic effects of catechin, caffeic acid and trans-resveratrol in apolipoprotein E deficient mice. *Atherosclerosis* 2007, 191:265-271.
 61. Jayaprakasam B, Vanisree M, Zhang Y, Dewitt DL, Nair MG. Impact of alkyl esters of caffeic and ferulic acids on tumor cell proliferation, cyclooxygenase enzyme, and lipid peroxidation. *J Agric Food Chem* 2006, 54:5375-5381.
 62. Hung CC, Tsai WJ, Kuo LM, Kuo YH. Evaluation of caffeic acid amide analogues

- as anti-platelet aggregation and anti-oxidative agents. *Bioorg Med Chem* 2005, 13:1791-1797.
63. Hsiao G, Lee JJ, Lin KH, Shen CH, Fong TH, Chou DS, Sheu JR. Characterization of a novel and potent collagen antagonist, caffeic acid phenethyl ester, in human platelets: In vitro and in vivo studies. *Cardiovasc Res* 2007, 75:782-792.
 64. Senter PD, Al-Abed Y, Metz CN, Benigni F, Mitchell RA, Chesney J, Han J, Gartner CG, Nelson SD, Todaro GJ, Bucala R. Inhibition of macrophage migration inhibitory factor (MIF) tautomerase and biological activities by acetaminophen metabolites. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, 99:144-149.
 65. Molnar V, Garai J. Plant-derived anti-inflammatory compounds affect MIF tautomerase activity. *Int Immunopharmacol* 2005, 5:849-856.
 66. Simonich SL, Hites RA. Global distribution of persistent organochlorine compounds. *Science* 1995, 269:1851-1854.
 67. Giusti M, Iwamoto K, Hatch EE. Diethylstilbestrol revisited: a review of the long-term health effects. *Ann Intern Med* 1995, 122:778-788.
 68. McLachlan JA. Environmental signaling: what embryos and evolution teach us about endocrine disrupting chemicals. *Endocr Rev* 2001, 22:319-341.
 69. Moore M, Mustain M, Daniel K, Chen I, Safe S, Zacharewski T, Gillesby B, Joyeux A, Balaguer P. Antiestrogenic activity of hydroxylated polychlorinated biphenyl congeners identified in human serum. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997, 142:160-168.
 70. Shekhar PV, Werdell J, Basrur VS. Environmental estrogen stimulation of growth and estrogen receptor function in preneoplastic and cancerous human breast cell lines. *J Natl Cancer Inst* 1997, 89:1774-1782.
 71. Paris F, Balaguer P, Térouanne B, Servant N, Lacoste C, Cravedi JP, Nicolas JC, Sultan C. Phenylphenols, biphenols, bisphenol-A and 4-tert-octylphenol exhibit alpha and beta estrogen activities and antiandrogen activity in reporter cell lines. *Mol Cell Endocrinol* 2002, 193:43-49.
 72. Nimrod AC, Benson WH. Environmental estrogenic effects of alkylphenol ethoxylates. *Crit Rev Toxicol* 1996, 26:335-364.
 73. Gomez E, Pillon A, Fenet H, Rosain D, Duchesne MJ, Nicolas JC, Balaguer P, Casellas C. Estrogenic activity of cosmetic components in reporter cell lines: parabens, UV screens, and musks. *J Toxicol Environ Health A* 2005, 68:239-251.
 74. Fisher BE. Most unwanted. *Environ Health Perspect* 1999, 107:A18-23.

75. Mackay D, Fraser A. Kenneth Mellanby Review Award. Bioaccumulation of persistent organic chemicals: mechanisms and models. *Environ Pollut* 2000, 110:375-391.
76. Sonnenschein C, Soto AM. An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1998, 65:143-150.
77. Soto A, Sonnenschein C, Chung KL, Fernandez MF, Olea N, Serrano FO. The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environment pollutants. *Environ Health Perspect* 1995, 103:113-122.
78. Welshons WV, Thayer KA, Judy BM, Taylor JA, Curran EM, vom Saal FS. Large effects from small exposures. I. Mechanisms for endocrine-disrupting chemicals with estrogenic activity. *Environ Health Perspect* 2003, 111:994-1006.
79. Fernandez MF, Molina-Molina JM, Lopez-Espinosa MJ, Freire C, Campoy C, Ibarluzea J, Torne P, Pedraza V, Olea N. Biomonitoring of environmental estrogens in human tissues. *Int J Hyg Environ Health* 2007, 210:429-432.
80. Fox JE, Starcevic M, Jones PE, Burow ME, McLachlan JA. Phytoestrogen signaling and symbiotic gene activation are disrupted by endocrine-disrupting chemicals. *Environ Health Perspect* 2004, 112:672-677.
81. Whitlock JP. Genetic and molecular aspects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin action. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1990, 30:251-277.
82. Safe S. Molecular biology of the Ah receptor and its role in carcinogenesis. *Toxicol Lett* 2001, 120:1-7.
83. Safe S, Wormke M, Samudio I. Mechanisms of inhibitory aryl hydrocarbon receptor-estrogen receptor crosstalk in human breast cancer cells. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2000, 5:295-306.
84. Swedenborg E, Pongratz I. AhR and ARNT modulate ER signaling. *Toxicology* 2010, 268:132-138.
85. Boverhof DR, Burgoon LD, Williams KJ, Zacharewski TR. Inhibition of estrogen-mediated uterine gene expression responses by dioxin. *Mol Pharmacol* 2008, 73:82-93.
86. Rüegg J, Swedenborg E, Wahlström D, Escande A, Balaguer P, Pettersson K, Pongratz I. The transcription factor aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator functions as an estrogen receptor beta-selective coactivator, and its recruitment to alternative pathways mediates antiestrogenic effects of dioxin. *Mol Endocrinol* 2008, 22:304-316.

87. Kitajima M, Khan KN, Fujishita A, Masuzaki H, Ishimaru T. Histomorphometric alteration and cell-type specific modulation of arylhydrocarbon receptor and estrogen receptor expression by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and 17beta-estradiol in mouse experimental model of endometriosis. *Reprod Toxicol* 2004, 18:793-801.
88. Yu J, Wang Y, Zhou WH, Wang L, He YY, Li DJ. Combination of estrogen and dioxin is involved in the pathogenesis of endometriosis by promoting chemokine secretion and invasion of endometrial stromal cells. *Hum Reprod* 2008, 23:1614-1626.
89. Dr Sohár Pálné, Dr Matyasovszky Katalin, Dr Páldy Anna, Vaskövi Béláné dr. 2003. A POP-ok környezet-egészségügyi jelentősége, élelmiszerekben mérhető szintjeik és egészségügyi kockázatuk (Összefoglaló). Fodor József Országos Közegészségügyi Központ (FJOKK).
90. PCBs, Dioxons, and Related Copound. Chapter 6. in: Donald T. Wigle. *Child Health and the Environment*. Oxford: Oxford University Press, 2003, pp. 396.
91. Rappe C. Dioxin, patterns and source identification. *Fresenius J Anal Chem* 1994, 348:63-75.
92. Rylander L, Strömberg U, Dyremark E, Ostman C, Nilsson-Ehle P, Hagmar L. Polychlorinated biphenyls in blood plasma among Swedish female fish consumers in relation to low birth weight. *Am J Epidemiol* 1998, 147:493-502.
93. Koopman-Esseboom C, Weisglas-Kuperus N, de Ridder MA, Van der Paauw CG, Tuinstra LG, Sauer PJ. Effects of polychlorinated biphenyl/dioxin exposure and feeding type on infants' mental and psychomotor development. *Pediatrics* 1996, 97:700-706.
94. Schantz SL, Widholm JJ, Rice DC. Effects of PCB exposure on neuropsychological function in children. *Environ Health Perspect* 2003, 111:357-376.
95. Boersma ER, Lanting CI. Environmental exposure to polychlorinated biphenyls (PCBs) and dioxins. Consequences for longterm neurological and cognitive development of the child lactation. *Adv Exp Med Biol* 2000, 478:271-287.
96. Buck GM, Sever LE, Mendola P, Zielezny M, Vena JE. Consumption of contaminated sport fish from Lake Ontario and time-to-pregnancy. *New York State Angler Cohort. Am J Epidemiol* 1997, 146:949-954.
97. Guo YL, Hsu PC, Hsu CC, Lambert GH. Semen quality after prenatal exposure to

- polychlorinated biphenyls and dibenzofurans. *Lancet* 2000, 356:1240-1241.
98. Pluim HJ, de Vijlder JJ, Olie K, Kok JH, Vulsma T, van Tijn DA, van der Slikke JW, Koppe JG. Effects of pre- and postnatal exposure to chlorinated dioxins and furans on human neonatal thyroid hormone concentrations. *Environ Health Perspect* 1993, 101:504-508.
 99. Koopman-Esseboom C, Morse DC, Weisglas-Kuperus N, Lutkeschipholt IJ, Van der Paauw CG, Tuinstra LG, Brouwer A, Sauer PJ. Effects of dioxins and polychlorinated biphenyls on thyroid hormone status of pregnant women and their infants. *Pediatr Res* 1994, 36:468-473.
 100. Nagayama J, Okamura K, Iida T, Hirakawa H, Matsueda T, Tsuji H, Hasegawa M, Sato K, Ma HY, Yanagawa T, Igarashi H, Fukushige J, Watanabe T. Postnatal exposure to chlorinated dioxins and related chemicals on thyroid hormone status in Japanese breast-fed infants. *Chemosphere* 1998, 37:1789-1793.
 101. Weisglas-Kuperus N, Patandin S, Berbers GA, Sas TC, Mulder PG, Sauer PJ, Hooijkaas H. Immunologic effects of background exposure to polychlorinated biphenyls and dioxins in Dutch preschool children. *Environ Health Perspect* 2000, 108:1203-1207.
 102. Schechter A, Olson JR. Cancer risk assessment using blood dioxin levels and daily dietary TEQ intake in general populations of industrial and non-industrial countries. *Chemosphere* 1997, 34:1569-1577.
 103. Demers A, Ayotte P, Brisson J, Dodin S, Robert J, Dewailly E. Plasma concentrations of polychlorinated biphenyls and the risk of breast cancer: a congener-specific analysis. *Am J Epidemiol* 2002, 155:629-635.
 104. IARC 1987. Overall Evaluations of Carcinogenicity: An Updating of IARC Monographs Volumes 1 to 42. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Supplement 7, Lyon France.
 105. IARC 1997. Polychlorinated Dibenzopara-dioxins and Polychlorinated Dibenzofurans. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Volume 69, Lyon France.
 106. Van den Berg M, Birnbaum LS, Denison M, De Vito M, Farland W, Feeley M, Fiedler H, Hakansson H, Hanberg A, Haws L, Rose M, Safe S, Schrenk D, Tohyama C, Tritscher A, Tuomisto J, Tysklind M, Walker N, Peterson RE. The 2005 World Health Organization reevaluation of human and mammalian toxic equivalency factors for dioxins and dioxin-like compounds. *Toxicol Sci* 2006,

- 93:223-241.
107. Fürst P, Beck H, Theelen RMC. Assessment of human intake of PCDDs and PCDFs from different environmental sources. *Toxic Subst J* 1992, 2:133-150.
 108. SCF 2001. Opinion of the Scientific Committee on Food on the risk assessment of dioxins and dioxin-like PCBs in food. Update based on new scientific information available since the adoption of the SCF Opinion of 22nd November 2000. Adopted on 30 May 2001. (CS/CNTM/DIOXIN/20 final) European Commission, Brussels, Belgium.
 109. JECFA 2001. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Fifty-seventh meeting, Rome, 5-14 June 2001. Summary and Conclusions. Annex 4, pp. 24-40.
 110. ENHIS 2009. Persistent organic pollutants in human milk, ENHIS fact sheet 4.3. (RPG4_Food_Ex2) European Environment and Health Information System, WHO Regional Office for Europe.
 111. Malisch R, van Leeuwen FXR. Results of the WHO-coordinated exposure study on the levels of PCBs, PCDDs, and PCDFs in human milk. *Organohalogen Compounds* 2003, 64:140-143.
 112. WHO 1996. Levels of PCBs, PCDDs and PCDFs in Human Milk: Second Round of WHO-coordinated exposure study, *Environmental Health in Europe* No. 3, WHO Regional Office for Europe, Copenhagen, Denmark.
 113. David J. Delayed hypersensitivity in vitro: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction. *Proc Nat Acad Sci USA* 1966, 56:72-77.
 114. Bloom BR, Bennett B. Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity. *Science* 1966, 153:80-82.
 115. George M, Vaughan JH. In vitro cell migration as a model for delayed hypersensitivity. *Proc Soc Exp Biol Med* 1962, 111:514-521.
 116. Waeber G, Calandra T, Roudot R, Haefliger JA, Bonny C, Thompson N, Thorens B, Temler E, Meinhardt A, Bacher M, Metz CN, Nicod P, Bucala R. Insulin secretion is regulated by the glucose-dependent production of islet beta cell macrophage migration inhibitory factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997, 94:4782-4787.
 117. Meinhardt A, Bacher M, McFarlane JR, Metz CN, Seitz J, Hedger MP, de Kretser DM, Bucala R. Macrophage migration inhibitory factor production by Leydig

- cells: evidence for a role in the regulation of testicular function. *Endocrinology* 1996, 137:5090-5095.
118. Nishino T, Bernhagen J, Shiiki H, Calandra T, Dohi K, Bucala R. Localization of macrophage migration inhibitory factor (MIF) to secretory granules within the corticotrophic and thyrotrophic cells of the pituitary gland. *Mol Med* 1995, 1:781-788.
 119. Magi B, Bini L, Liberatori S, Marzocchi B, Raggiaschi R, Arcuri F, Tripodi SA, Cintorino M, Tosi P, Pallini V. Charge heterogeneity of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human liver and breast tissue. *Electrophoresis* 1998, 19:2010-2013.
 120. Weiser WY, Temple PA, Witek-Giannotti JS, Remold HG, Clark SC, David JR. Molecular cloning of a cDNA encoding a human macrophage migration inhibitory factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989, 86:7522-7526.
 121. Bernhagen J, Calandra T, Mitchell RA, Martin SB, Tracey KJ, Voelter W, Manogue KR, Cerami A, Bucala R. MIF is a pituitary-derived cytokine that potentiates lethal endotoxaemia. *Nature* 1993, 365:756-759.
 122. Bernhagen J, Mitchell RA, Calandra T, Voelter W, Cerami A, Bucala R. Purification, bioactivity, and secondary structure analysis of mouse and human macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Biochemistry* 1994, 33:14144-14155.
 123. Suzuki M, Sugimoto H, Nakagawa A, Tanaka I, Nishihira J, Sakai M. Crystal structure of the macrophage migration inhibitory factor from rat liver. *Nat Struct Biol* 1996, 3:259-266.
 124. Sun HW, Bernhagen J, Bucala R, Lolis E. Crystal structure at 2.6-Å resolution of human macrophage migration inhibitory factor. *Proc Nat Acad Sci USA* 1996, 93:5191-5196.
 125. Calandra T, Roger T. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2003, 3:791-800.
 126. Sato A, Uinuk-ool TS, Kuroda N, Mayer WE, Takezaki N, Dongak R, Figueroa F, Cooper MD, Klein J. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) of jawed and jawless fishes: implications for its evolutionary origin. *Dev Comp Immunol* 2003, 27:401-412.
 127. Jaworski DC, Jasinskas A, Metz CN, Bucala R, Barbour AG. Identification and characterization of a homologue of the pro-inflammatory cytokine Macrophage

- Migration Inhibitory Factor in the tick, *Amblyomma americanum*. *Insect Mol. Biol* 2001, 10:323-331.
128. Pastrana DV, Raghavan N, FitzGerald P, Eisinger SW, Metz C, Bucala R, Schleimer RP, Bickel C, Scott AL. Filarial nematode parasites secrete a homologue of the human cytokine macrophage migration inhibitory factor. *Infect Immun* 1998, 66:5955-5963.
 129. Guiliano DB, Hall N, Jones SJ, Clark LN, Corton CH, Barrell BG, Blaxter ML. Conservation of long-range synteny and microsynteny of the genomes of two distantly related nematodes. *Genome Biol* 2002, 3:research0057.1-0057.14.
 130. Jüttner S, Bernhagen J, Metz CN, Röllinghoff M, Bucala R, Gessner A. Migration inhibitory factor induces killing of *Leishmania major* by macrophages: dependence on reactive nitrogen intermediates and endogenous TNF- α . *J. Immunol* 1998, 161:2383-2390.
 131. Satoskar AR, Bozza M, Rodriguez Sosa M, Lin G, David JR. Migration-inhibitory factor gene-deficient mice are susceptible to cutaneous *Leishmania major* infection. *Infect Immun* 2001, 69:906-911.
 132. Bacher M, Metz CN, Calandra T, Mayer K, Chesney J, Lohoff M, Gemsa D, Donnelly T, Bucala R. An essential regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in T-cell activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, 93:7849-7854.
 133. Onodera S, Kaneda K, Mizue Y, Koyama Y, Fujinaga M, Nishihira J. Macrophage migration inhibitory factor up-regulates expression of matrix metalloproteinases in synovial fibroblasts of rheumatoid arthritis. *J Biol Chem* 2000, 275:444-450.
 134. Onodera S, Nishihira J, Iwabuchi K, Koyama Y, Yoshida K, Tanaka S, Minami A. Macrophage migration inhibitory factor up-regulates matrix metalloproteinase-9 and -13 in rat osteoblasts. Relevance to intracellular signaling pathways. *J Biol Chem* 2002, 277:7865-7874.
 135. Sampey AV, Hall PH, Mitchell RA, Metz CN, Morand EF. Regulation of synoviocyte phospholipase A2 and cyclooxygenase 2 by macrophage migration inhibitory factor. *Arthritis Rheum* 2001, 44:1273-1280.
 136. Leng L, Metz CN, Fang Y, Xu J, Donnelly S, Baugh J, Delohery T, Chen Y, Mitchell RA, Bucala R. MIF signal transduction initiated by binding to CD74. *J Exp Med* 2003, 197:1467-1476.
 137. Mitchell RA, Metz CN, Peng T, Bucala R. Sustained mitogen-activated protein

- kinase (MAPK) and cytoplasmic phospholipase A2 activation by macrophage migration inhibitory factor (MIF). Regulatory role in cell proliferation and glucocorticoid action. *J Biol Chem* 1999, 274:18100-18106.
138. Murakami M, Nakatani Y, Atsumi G, Inoue K, Kudo I. Regulatory functions of phospholipase A2. *Crit Rev Immunol* 1997, 17:225-283.
 139. Roger T, David J, Glauser MP, Calandra T. MIF regulates innate immune responses through modulation of Toll-like receptor 4. *Nature* 2001, 414:920-924.
 140. Bozza M, Satoskar AR, Lin G, Lu B, Humbles AA, Gerard C, David JR. Targeted disruption of migration inhibitory factor gene reveals its critical role in sepsis. *J Exp Med* 1999, 189:341-346.
 141. Hudson JD, Shoaibi MA, Maestro R, Carnero A, Hannon GJ, Beach DH. A proinflammatory cytokine inhibits p53 tumor suppressor activity. *J Exp Med* 1999, 190:1375-1382.
 142. Shimizu T, Abe R, Nakamura H, Ohkawara A, Suzuki M, Nishihira J. High expression of macrophage migration inhibitory factor in human melanoma cells and its role in tumor cell growth and angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 1999, 264:751-758.
 143. Meyer-Siegler K, Hudson PB. Enhanced expression of macrophage migration inhibitory factor in prostatic adenocarcinoma metastases. *Urology* 1996, 48:448-452.
 144. Mitchell RA, Liao H, Chesney J, Fingerle-Rowson G, Baugh J, David J, Bucala R. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) sustains macrophage proinflammatory function by inhibiting p53: regulatory role in the innate immune response. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, 99:345-350.
 145. Mahidhara R, Billiar TR. Apoptosis in sepsis. *Crit Care Med* 2000, 28:N105-113.
 146. Albina JE, Cui S, Mateo RB, Reichner JS. Nitric oxide-mediated apoptosis in murine peritoneal macrophages. *J Immunol* 1993, 150:5080-5085.
 147. Kleemann R, Hausser A, Geiger G, Mischke R, Burger-Kentischer A, Flieger O, Johannes FJ, Roger T, Calandra T, Kapurniotu A, Grell M, Finkelmeier D, Brunner H, Bernhagen J. Intracellular action of the cytokine MIF to modulate AP-1 activity and the cell cycle through Jab-1. *Nature* 2000, 408:211-216.
 148. Calandra T, Spiegel LA, Metz CN, Bucala R. Macrophage migration inhibitory factor is a critical mediator of the activation of immune cells by exotoxins of Gram-positive bacteria. *Proc Nat Acad Sci USA* 1998, 95:11383-11388.

149. Calandra T, Echtenacher B, Roy DL, Pugin J, Metz CN, Hültner L, Heumann D, Männel D, Bucala R, Glauser MP. Protection from septic shock by neutralization of macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Nat Med* 2000, 6:164-170.
150. Bernhagen J, Bacher M, Calandra T, Metz CN, Doty SB, Donnelly T, Bucala R. An essential role for macrophage migration inhibitory factor in the tuberculin delayed-type hypersensitivity reaction. *J Exp Med* 1996, 183:277-282.
151. Lan HY, Bacher M, Yang N, Mu W, Nikolic-Paterson DJ, Metz C, Meinhardt A, Bucala R, Atkins RC. The pathogenic role of macrophage migration inhibitory factor in immunologically induced kidney disease in the rat. *J Exp Med* 1997, 185:1455-1465.
152. Lan HY, Mu W, Yang N, Meinhardt A, Nikolic-Paterson DJ, Ng YY, Bacher M, Atkins RC, Bucala R. De Novo renal expression of macrophage migration inhibitory factor during the development of rat crescentic glomerulonephritis. *Am J Pathol* 1996, 149:1119-1127.
153. Leech M, Metz C, Bucala R, Morand EF. Regulation of macrophage migration inhibitory factor by endogenous glucocorticoids in rat adjuvant-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2000, 43:8827-833.
154. Mikulowska A, Metz CN, Bucala R, Holmdahl R. Macrophage migration inhibitory factor is involved in the pathogenesis of collagen type II-induced arthritis in mice. *J Immunol* 1997, 158:5514-5517.
155. Leech M, Metz C, Santos L, Peng T, Holdsworth SR, Bucala R, Morand EF. Involvement of macrophage migration inhibitory factor in the evolution of rat adjuvant arthritis. *Arthritis Rheum* 1998, 41:910-917.
156. Brown FG, Nikolic-Paterson DJ, Metz C, Bucala R, Atkins RC, Lan HY. Up-regulation of macrophage migration inhibitory factor in acute renal allograft rejection in the rat. *Clin Exp Immunol* 1999, 118:329-336.
157. Hou G, Valujskikh A, Bayer J, Stavitsky AB, Metz C, Heeger PS. In vivo blockade of macrophage migration inhibitory factor prevents skin graft destruction after indirect allorecognition. *Transplantation* 2001, 72:1890-1897.
158. Takahashi N, Nishihira J, Sato Y, Kondo M, Ogawa H, Ohshima T, Une Y, Todo S. Involvement of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in the mechanism of tumor cell growth. *Mol Med* 1998, 4:707-714.
159. Chesney J, Metz C, Bacher M, Peng T, Meinhardt A, Bucala R. An essential role for macrophage migration inhibitory factor (MIF) in angiogenesis and the growth

- of a murine lymphoma. *Mol Med* 1999, 5:181-191.
160. Ogawa H, Nishihira J, Sato Y, Kondo M, Takahashi N, Oshima T, Todo S. An antibody for macrophage migration inhibitory factor suppresses tumour growth and inhibits tumour-associated angiogenesis. *Cytokine* 2000, 12:309-314.
 161. de Jong YP, Abadia-Molina AC, Satoskar AR, Clarke K, Rietdijk ST, Faubion WA, Mizoguchi E, Metz CN, Alshali M, ten Hove T, Keates AC, Lubetsky JB, Farrell RJ, Michetti P, van Deventer SJ, Lolis E, David JR, Bhan AK, Terhorst C. Development of chronic colitis is dependent on the cytokine MIF. *Nat Immunol* 2001, 2:1061-1066.
 162. Donnelly SC, Haslett C, Reid PT, Grant IS, Wallace WA, Metz CN, Bruce LJ, Bucala R. Regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in acute respiratory distress syndrome. *Nat Med* 1997, 3:320-323.
 163. Lin SG, Yu XY, Chen YX, Huang XR, Metz C, Bucala R, Lau CP, Lan HY. De novo expression of macrophage migration inhibitory factor in atherogenesis in rabbits. *Circ Res* 2000, 87:1202-1208.
 164. Martiney JA, Sherry B, Metz CN, Espinoza M, Ferrer AS, Calandra T, Broxmeyer HE, Bucala R. Macrophage migration inhibitory factor release by macrophages after ingestion of *Plasmodium chabaudi*-infected erythrocytes: possible role in the pathogenesis of malaria anemia. *Infect Immun* 2000, 68:2259-2267.
 165. Denkinger CM, Denkinger M, Kort JJ, Metz C, Forsthuber TG. In vivo blockage of macrophage migration inhibitory factor ameliorates acute experimental autoimmune encephalomyelitis by impairing the homing of encephalitogenic T cells to the central nervous system. *J Immunol* 2003, 170:1274-1282.
 166. Metz CN, Bucala R. Role of macrophage migration inhibitory factor in the regulation of the immune response. *Adv Immunol* 1997, 66:197-223.
 167. Onodera S, Tanji H, Suzuki K, Kaneda K, Mizue Y, Sagawa A, Nishihira J. High expression of macrophage migration inhibitory factor in the synovial tissues of rheumatoid joints. *Cytokine* 1999, 11:163-167.
 168. Morand EF, Leech M, Weedon H, Metz C, Bucala R, Smith MD. Macrophage migration inhibitory factor in rheumatoid arthritis: clinical correlations. *Rheumatology* 2002, 41:558-562.
 169. Leech M, Metz C, Hall P, Hutchinson P, Gianis K, Smith M, Weedon H, Holdsworth SR, Bucala R, Morand EF. Macrophage migration inhibitory factor in rheumatoid arthritis: Evidence of proinflammatory function and regulation by

- glucocorticoids. *Arthritis Rheum* 1999, 42:1601-1608.
170. Rosengren E, Bucala R, Aman P, Jacobsson L, Odh G, Metz CN, Rorsman H. The immunoregulatory mediator macrophage migration inhibitory factor (MIF) catalyzes a tautomerization reaction. *Mol Med* 1996, 2:143-149.
171. Rosengren E, Aman P, Thelin S, Hansson C, Ahlfors S, Björk P, Jacobsson L, Rorsman H. The macrophage migration inhibitory factor MIF is a phenylpyruvate tautomerase. *FEBS Lett* 1997, 417:85-88.
172. Matsunaga J, Sinha D, Pannell L, Santis C, Solano F, Wistow GJ, Hearing VJ. Enzyme activity of macrophage migration inhibitory factor toward oxidized catecholamines. *J Biol Chem* 1999, 274:3268-3271.
173. Kleemann R, Kapurniotu A, Frank RW, Gessner A, Mischke R, Flieger O, Jüttner S, Brunner H, Bernhagen J. Disulfide analysis reveals a role for macrophage migration inhibitory factor (MIF) as thiol-protein oxidoreductase. *J Mol Biol* 1999, 280:85-102.
174. Kleemann R, Mischke R, Kapurniotu A, Brunner H, Bernhagen J. Specific reduction of insulin disulfides by macrophage migration inhibitory factor (MIF) with glutathione and dihydrolipoamide: potential role in cellular redox processes. *FEBS Lett* 1998, 430:191-196.
175. Kleemann R, Kapurniotu A, Mischke R, Held J, Bernhagen J. Characterization of catalytic centre mutants of macrophage migration inhibitory factor (MIF) and comparison to Cys81Ser MIF. *Eur J Biochem* 1999, 261:753-766.
176. Lubetsky JB, Dios A, Han J, Aljabari B, Ruzsicska B, Mitchell R, Lolis E, Al-Abed Y. The tautomerase active site of macrophage migration inhibitory factor is a potential target for discovery of novel anti-inflammatory agents. *J Biol Chem* 2002, 277:24976-24982.
177. Dios A, Mitchell RA, Aljabari B, Lubetsky J, O'Connor K, Liao H, Senter PD, Manogue KR, Lolis E, Metz C, Bucala R, Callaway DJ, Al-Abed Y. Inhibition of MIF bioactivity by rational design of pharmacological inhibitors of MIF tautomerase activity. *J Med Chem* 2002, 45:2410-2416.
178. Zhang X, Bucala R. Inhibition of macrophage migration inhibitory factor (MIF) tautomerase activity by dopachrome analogs. *Bioorg Med Chem Lett* 1999, 9:3193-3198.
179. Kris-Etherton PM, Hecker KD, Bonanome A, Coval SM, Binkoski AE, Hilpert KF, Griel AE, Etherton TD. Bioactive compounds in foods: their role in the

- prevention of cardiovascular disease and cancer. *Am J Med* 2002, 113:71S-88S.
180. Huang HM, Johannig GL, O'Dell BL. Phenolic acid content of food plants and possible nutritional implications. *J Agric Food Chem* 1986, 34:48-51.
181. Fuhrman B, Lavy M, Aviram M. Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density lipoprotein to lipid peroxidation. *Am J Clin Nutr* 1995, 61:549-554.
182. Panagiotakos DB, Pitsavos C, Chrysohoou C, Kokkinos P, Toutouzas P, Stefanadis C. The J-shaped effect of coffee consumption on the risk of developing acute coronary syndromes: The CARDIO2000 case-control study. *J Nutr* 2003, 133:3228-3232.
183. Natella F, Nardini M, Belevi F, Pignatelli P, Di Santo S, Ghiselli A, Violi F, Scaccini C. Effect of coffee drinking on platelets: inhibition of aggregation and phenols incorporation. *Br J Nutr* 2008, 100:1276-1282.
184. Lopez-Garcia E, van Dam RM, Li TY, Rodriguez-Artalejo F, Hu FB. The relationship of coffee consumption with mortality. *Ann Intern Med* 2008, 148:904-914.
185. Lopez-Garcia E, Rodriguez-Artalejo F, Rexrode KM, Logroscino G, Hu FB, van Dam RM. Coffee consumption and risk of stroke in women. *Circulation* 2009, 119:1116-1123.
186. Nardini M, Cirillo E, Natella F, Scaccini C. Absorption of phenolic acids in human after coffee consumption. *J Agric Food Chem* 2002, 50:5735-5741.
187. Olthof MR, Hollman PC, Katan MB. Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *J Nutr* 2001, 131:66-71.
188. Kocsis I, Hagymasi K, Kery A, Szoke E, Blazovics A. Effects of chicory on pancreas status of rats in experimental dislipidemia. *Acta Biol Szeged* 2003, 47:143-146.
189. Galasko GT, Furman KI, Alberts E. The caffeine contents of non-alcoholic beverages. *Food Chem Toxicol* 1989, 27:49-51.
190. Born GV, Cross MJ. The aggregation of blood platelets. *J Physiol* 1963, 168:178-195.
191. Toth K, Habon T, Horvath I, Mezey B, Juricskay I, Mozsik Gy. Hemorheological and hemodynamical parameters in patients with ischemic heart disease at rest and at peak exercise. *Clin Hemorheol* 1994, 14:329-338.
192. Hardeman MR, Goedhart PT, Dobbe JGG, Lettinga KP. Laser-assisted Optical

- Rotational Cell Analyzer (LORCA). I. A new instrument for measurement of various structural hemorheological parameters. *Clin Hemorheol* 1994, 14:605-618.
193. Johnson RM. Ektacytometry of red blood cells. *Methods Enzymol* 1989, 173:35-54.
194. Baskurt OK, Gelmont D, Meiselman HJ. Red blood cell deformability in sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 1998, 157:421-427.
195. Singh N, Rajini PS. Antioxidant-mediated protective effect of potato peel extract in erythrocytes against oxidative damage. *Chem Biol Interact* 2008, 173:97-104.
196. Amin MA, Haas CS, Zhu K, Mansfield PJ, Kim MJ, Lackowski NP, Koch AE. Migration inhibitory factor up-regulates vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 via Src, PI3 kinase, and NFkappaB. *Blood* 2006, 107:2252-2261.
197. Broekhuizen LN, van Wijk DF, Vink H, Stalmach A, Crozier A, Hutten BA, Kastelein JJ, Hugenholtz PG, Koenig W, Stroes ES. Reduction of monocyte chemoattractant protein 1 and macrophage migration inhibitory factor by a polyphenol-rich extract in subjects with clustered cardiometabolic risk factors. *Br J Nutr* 2011, 106:1416-1422.
198. Gallenberg LA, Vodcnik MJ. Transfer of persistent chemicals in milk. *Drug Metab Rev* 1987, 21:277-317.
199. Barr DB, Wang RY, Needham LL. Biologic monitoring of exposure to environmental chemicals throughout the life stages: requirements and issues for consideration for the National Children's Study. *Environ Health Perspect* 2005, 113:1083-1091.
200. Abraham K, Knoll A, Ende M, Pöpke O, Helge H. Intake, fecal excretion, and body burden of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in breast-fed and formula-fed infants. *Pediatr Res* 1996, 40:671-679.
201. Patandin S, Dagnelie PC, Mulder PG, Op de Coul E, van der Veen JE, Weisglas-Kuperus N, Sauer PJ. 1999. Dietary exposure to polychlorinated biphenyls and dioxins from infancy until adulthood: A comparison between breast-feeding, toddler, and long-term exposure. *Environ Health Perspect* 1999, 107:45-51.
202. WHO 1989. Levels of PCBs, PCDDs and PCDFs in breast milk, Environmental Health Series No. 34, WHO Regional Office for Europe, Copenhagen, Denmark.
203. US EPA Method 1613: Tetra-through octa-chlorinated dioxin and furans by isotope dilution HRGC/HRMS (Revision B), October 1994, U.S. Environmental

- Protection Agency, Engineering and Analysis Division, Office of Water, Washington, D.C.
204. Colles A, Koppen G, Hanot V, Nelen V, Dewolf MC, Noël E, Malisch R, Kotz A, Kypke K, Biot P, Vinkx C, Schoeters G. Fourth WHO-coordinated survey of human milk for persistent organic pollutants (POPs): Belgian results. *Chemosphere* 2008, 73:907-914.
 205. Raab U, Preiss U, Albrecht M, Shahin N, Parlar H, Fromme H. Concentrations of polybrominated diphenyl ethers, organochlorine compounds and nitro musks in mother's milk from Germany (Bavaria). *Chemosphere* 2008, 72:87-94.
 206. Schuhmacher M, Kiviranta H, Ruokojärvi P, Nadal M, Domingo JL. Concentrations of PCDD/Fs, PCBs and PBDEs in breast milk of women from Catalonia, Spain: a follow-up study. *Environ Int* 2009, 35:607-613.
 207. Ackefors H. 1989. A regional survey of the aquaculture sector in Eastern and Northwestern Europe. (ADCP/REP/89/38) Food and Agriculture Organization of the United Nations FAO, Rome, Italy.
 208. Byrd-Bredbenner C, Lagiou P, Trichopoulou A. A comparison of household food availability in 11 countries. *J Hum Nutr Diet* 2000, 13:197-204.
 209. Kostyniak PJ, Stinson C, Greizerstein HB, Vena J, Buck G, Mendola P. Relation of Lake Ontario fish consumption, lifetime lactation, and parity to breast milk polychlorobiphenyl and pesticide concentrations. *Environ Res* 1999, 80:S166-S174.
 210. Egorov A, Mikhailov G, Altshul L. Fish consumption and breast milk concentrations of PCBs and chlorinated pesticides in the Astrakhan region, Russia. *Organohalogen Compd* 2003, 64:91-94.
 211. Takekuma M, Saito K, Ogawa M, Matumoto R, Kobayashi S. Levels of PCDDs, PCDFs and co-PCBs in human milk in Saitama, Japan, and epidemiological research. *Chemosphere* 2004, 54:127-135.
 212. Bergkvist C, Oberg M, Appelgren M, Becker W, Aune M, Ankarberg EH, Berglund M, Håkansson H. Exposure to dioxin-like pollutants via different food commodities in Swedish children and young adults. *Food Chem Toxicol* 2008, 46:3360-3367.
 213. Nakamura T, Nakai K, Matsumura T, Suzuki S, Saito Y, Satoh H. Determination of dioxins and polychlorinated biphenyls in breast milk, maternal blood and cord blood from residents of Tohoku, Japan. *Sci Total Environ* 2008, 394:39-51.

214. Albers JM, Kreis IA, Liem AK, van Zoonen P. Factors that influence the level of contamination of human milk with poly-chlorinated organic compounds. *Arch Environ Contam Toxicol* 1996, 30:285-291.
215. Agostoni C, Marangoni F, Lammardo AM, Giovannini M, Riva E, Galli C. Breastfeeding duration, milk fat composition and developmental indices at 1 year of life among breastfed infants. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2001, 64:105-109.
216. Yu Z, Palkovicova L, Drobna B, Petrik J, Kocan A, Trnovec T, Hertz-Picciotto I. Comparison of organochlorine compound concentrations in colostrum and mature milk. *Chemosphere* 2007, 66:1012-1018.
217. Arcus-Arth A, Krowech G, Zeise L. Breast milk and lipid intake distributions for assessing cumulative exposure and risk. *J Expo Anal Environ Epidemiol* 2005, 15:357-365.
218. Wootwards DR, Rees B, Boon JA. Human milk fat content: within-feed variation. *Early Hum Dev* 1989, 19:39-46.
219. Mitoulas LR, Kent JC, Cox DB, Owens RA, Sherriff JL, Hartmann PE. Variation in fat, lactose and protein in human milk over 24 h and throughout the first year of lactation. *Br J Nutr* 2002, 88:29-37.
220. Kent JC, Mitoulas LR, Cregan MD, Ramsay DT, Doherty DA, Hartmann PE. Volume and frequency of breastfeedings and fat content of breast milk throughout the day. *Pediatrics* 2006, 117:e387-395.
221. Takekuma M, Saito K, Falandysz J, Nakazawa H. Ratio variation of congener profiles of PCDD/Fs and dioxin-like PCBs in human milk during lactation. *Sci Total Environ* 2011, 409:1368-1377.
222. LaKind JS, Berlin CM, Naiman DQ. Infant exposure to chemicals in breast milk in the United States: what we need to learn from a breast milk monitoring program. *Environ Health Perspect* 2001, 109:75-88.
223. Ramos L, Hernández LM, González MJ. Variation of PCB congener levels during lactation period and relationship to their molecular structure. *Arch Environ Contam Toxicol* 1997, 33:97-103.
224. Thomsen C, Haug LS, Stigum H, Frøshaug M, Broadwell SL, Becher G. Changes in concentrations of perfluorinated compounds, polybrominated diphenyl ethers, and polychlorinated biphenyls in Norwegian breast-milk during twelve months of lactation. *Environ Sci Technol* 2010, 44:9550-9556.

225. Hooper K, She J, Sharp M, Chow J, Jewell N, Gephart R, Holden A. Depuration of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) in breast milk from California first-time mothers (primiparae). *Environ Health Perspect* 2007, 115:1271-1275.
226. LaKind JS, Berlin CM Jr, Sjödin A, Turner W, Wang RY, Needham LL, Paul IM, Stokes JL, Naiman DQ, Patterson DG Jr. Do human milk concentrations of persistent organic chemicals really decline during lactation? Chemical concentrations during lactation and milk/serum partitioning. *Environ Health Perspect* 2009, 117:1625-1631.
227. Beck H, Dross A, Mathar W. PCDD and PCDF exposure and levels in humans in Germany. *Environ Health Perspect* 1994, 102:173-185.
228. Hanson L. Session 1: Feeding and infant development breast-feeding and immune function. *Proc Nutr Soc* 2007, 66:384-396.
229. Chirico G, Marzollo R, Cortinovis S, Fonte C, Gasparoni A. Antiinfective properties of human milk. *J Nutr* 2008, 138:1801S-1806S.
230. Cattaneo A, Yngve A, Koletzko B, Guzman LR; 'Promotion of Breastfeeding in Europe' project. Protection, promotion and support of breast-feeding in Europe: current situation. *Public Health Nutr* 2005, 8:39-46.
231. Dewey KG, Heinig MJ, Nommsen LA, Lonnerdal B. Maternal versus infant factors related to breast milk intake and residual milk volume: the DARLING study. *Pediatrics* 1991, 87:829-837.
232. Anderson JW, Johnstone BM, Remley DT. Breast-feeding and cognitive development: a meta-analysis. *Am J Clin Nutr* 1990, 70:525-535.
233. WHO 2001. The optimal duration of exclusive breastfeeding. Report of an expert consultation. (WHO/NHD/01.09, WHO/FCH/CAH/01.24) World Health Organization, Geneva, Switzerland
234. Oladapo OT, Fawole B: Treatments for suppression of lactation. *Cochrane Database Syst Rev* 2009, (1):CD005937.
235. Stanford JL, Szklo M, Brinton LA. Estrogen receptors and breast cancer. *Epidemiol Rev* 1986, 8:42-59.
236. Thorpe SM. Estrogen and progesterone receptor determinations in breast cancer. Technology, biology and clinical significance. *Acta Oncol* 1988, 27:1-19.
237. Bando H, Matsumoto G, Bando M, Muta M, Ogawa T, Funata N, Nishihira J, Koike M, Toi M. Expression of macrophage migration inhibitory factor in human

- breast cancer: association with nodal spread. *Jpn J Cancer Res* 2002, 93:389-396.
238. Xu X, Wang B, Ye C, Yao C, Lin Y, Huang X, Zhang Y, Wang S. Overexpression of macrophage migration inhibitory factor induces angiogenesis in human breast cancer. *Cancer Lett* 2008, 261:147-157.
239. Verjans E, Noetzel E, Bektas N, Schütz AK, Lue H, Lennartz B, Hartmann A, Dahl E, Bernhagen J. Dual role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human breast cancer. *BMC Cancer* 2009, 9:230.
240. Hmaosh M. Bioactive factors in human milk. *Pediatr Clin North Am* 2001, 48:69-86.
241. Garofalo RP, Goldman AS. Cytokines, chemokines, and colony-stimulating factors in human milk: the 1997 update. *Biol Neonate* 1998, 74:134-142.
242. Magi B, Ietta F, Romagnoli R, Liberatori S, Pallini V, Bini L, Tripodi S, Cintonio M, Chellini F, Arcuri F, De Felice C, Paulesu L. Presence of macrophage migration inhibitory factor in human milk: evidence in the aqueous phase and milk fat globules. *Pediatr Res* 2002, 51:619-624.
243. Bocci V. The oropharyngeal delivery of interferons: where are we and where do we need to go? *J Interferon Cytokine Res* 1999, 19:859-861.
244. Hawkes JS, Bryan DL, James MJ, Gibson RA. Cytokines (IL-1beta, IL-6, TNF-alpha, TGF-beta1, and TGF-beta2) and prostaglandin E2 in human milk during the first three months postpartum. *Pediatr Res* 1999, 46:194-199.
245. Montagne P, Cuillière ML, Molé C, Béné MC, Faure G. Immunological and nutritional composition of human milk in relation to prematurity and mothers' parity during the first 2 weeks of lactation. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1999, 29:75-80.
246. Saarela T, Kokkonen J, Koivisto M. Macronutrient and energy contents of human milk fractions during the first six months of lactation. *Acta Paediatr* 2005, 94:1176-1181.
247. Bryan DL, Hawkes JS, Gibson RA. Interleukin-12 in human milk. *Pediatr Res* 1999, 45:858-859.
248. Fituch CC, Palkowetz KH, Goldman AS, Schanler RJ. Concentrations of IL-10 in preterm human milk and in milk from mothers of infants with necrotizing enterocolitis. *Acta Paediatr* 2004, 93:1493-1500.

10. Publikációs jegyzék

Közlemények:

1. **Vigh É**, Molnár V, Garai J, Varga T, Koppán M, Bódis J. Endometriózis: az ektópiásan túlélő szövet ártalma. I. rész: Az endometriózis patomechanizmusa. Magyar Nőorvosok Lapja 2009, 72(2): 79-97.

2. **Vigh É**, Molnár V, Garai J, Varga T, Koppán M, Bódis J. Endometriózis: az ektópiásan túlélő szövet ártalma. II. rész: Az endometriózis klinikuma. Magyar Nőorvosok Lapja 2009, 72(3): 141-148.

3. Lóránd T, **Vigh É**, Garai J. Hormonal action of plant derived and anthropogenic non-steroidal estrogenic compounds: phytoestrogens and xenoestrogens. Current Medicinal Chemistry 2010, 17(30): 3542-3574.

Független citáció: 9

(IF: 4,630)

4. **Vigh É**, Bódis J, Garai J. Longitudinal changes in macrophage migration inhibitor factor in breast milk during the first three months of lactation. Journal of Reproductive Immunology 2011, 89(1): 92-94.

Független citáció: 1

(IF/2010: 2,204)

5. Schumacher E, **Vigh É**, Molnár V, Kenyeres P, Fehér G, Késmárky G, Tóth K, Garai J. Thrombosis preventive potential of chicory coffee consumption: a clinical study. Phytotherapy Research 2011, 25(5): 744-748.

Független citáció: 0

(IF/2010: 1,878)

6. **Vigh É**, Colombo A, Benfenati E, Håkansson H, Berglund M, Bódis J, Garai J. Changes in concentrations of PCBs and PCDD/Fs in breast milk from Hungary during the first three months of lactation. (kézirat beküldve)

Idézhető előadáskivonatok:

1. Garai J, Molnár V, Gabrieli P, **Vigh É**. The enzymatic activity of MIF cytokine might functionally contribute to its activation mechanisms. *Acta Physiologica Hungarica* 2004, Vol 91, No. 3-4: 297.
2. Molnár V, Gabrieli P, Németh E, Schumacher E, **Vigh É**, Garai J. The effects of plant phenols and polyphenols on the enzyme activity of macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Acta Physiologica Hungarica* 2005, Vol 92, No. 3-4: 286.
3. **Vigh É**, Gabrieli P, Schumacher E, Molnár V, Garai J. Anti-inflammatory molecules affect macrophage migration inhibitory factor and tubulin polymerization. *Acta Physiologica Hungarica* 2005, Vol 92, No. 3-4: 319-321.
4. Schumacher E, **Vigh É**, Bíróné Molnár V, Kenyeres P, Fehér G, Késmárky G, Garai J, Tóth K. A kávésav in vivo hemoreológiai és trombocita aggregáció gátló hatásának vizsgálata. *Érbetegségek* 2007, Suppl. 1: 16.
5. **Vigh É**, Schumacher E, Molnár V, Kenyeres P, Fehér G, Garai J. The effects of chicory coffee consumption on serum MIF level, on haemorheological parameters and on platelet aggregation. *Acta Physiologica Hungarica* 2007, Vol 94, No. 4: 402-403.
(IF: 0,453)
6. Garai J, Schumacher E, **Vigh É**, Molnár V, Kenyeres P, Fehér G, Késmárky G, Tóth K. Hemorheologic and thrombosis preventive potential of chicory coffee consumption: a clinical study. *Journal of Vascular Research* 2008, 45 (Suppl 2): 79. **(IF: 2,463)**
7. **Vigh É**, Bódis J, Garai J. Macrophage migration inhibitor factor in breast milk during the first 3 months of lactation. *Acta Physiologica Hungarica* 2010, Vol 97, No. 1: 147.
(IF: 1,226)
8. **Vigh É**, Colombo A, Benfenati E, Håkansson H, Berglund M, Garai J. Exposure assessment of breastfed infants in Hungary to persistent organic pollutants. *Acta Physiologica Hungarica*, 2010, Vol 97, No. 3: 335.
(IF: 1,226)

9. Garai J, **Vigh É**, Lóránd T. The macrophage migration inhibitory factor (MIF) alias the *most interesting factor*. Acta Physiologica Hungarica 2010, Vol 97, No. 4: 440-441.

(IF: 1,226)

10. **Vigh É**, Schumacher E, Molnár V, Kenyeres P, Fehér G, Késmárky G, Tóth K, Garai J. Chicory coffee: a thrombosis preventive beverage? Acta Physiologica Hungarica 2010, Vol 97, No. 4: 484-485.

(IF: 1,226)

11. Németh Á, Lenkey Zs, Ajtay Z, Cziráki A, Sulyok E, Horváth I, Szabados S, **Vigh É**, Lobenhoffer JM, Awiszus F, Bode-Böger SM. Stent implantáció hatása a koszorúérbetegek aszimmetrikus dimetilarginin (ADMA) szintjére akut miokardiális infarktus után. Cardiologia Hungarica 2010, 40: G65.

12. Párniczky A, Solymár M, **Vigh É**, Miseta A, Németh Á, Lenkey Zs, Szabados S, Cziráki A, Koller Á. A perikardiális folyadék összetétele koszorúér-revaszkularizációs műtéten (CABG) és műbillentyűbeültetésen átesett (VR) betegekben. Cardiologia Hungarica 2011, 41: F39-40.

Konferencia előadások:

1. Garai J, Molnár V, Gabrieli P, **Vigh É**. A MIF citokin enzimaktivitásának egyes funkciói hozzájárulhatnak a hatásmechanizmushoz. Magyar Élettani Társaság LXVIII. Vándorgyűlése, 2004. június 7-9. Debrecen

2. Bíróné Molnár V, Gabrieli P, Németh E, Schumacher E, **Vigh É**, Garai J. Növényi fenolok és polifenolok hatása a makrofág migráció inhibitor faktor (MIF) enzimaktivására. Magyar Élettani Társaság LXIX. Vándorgyűlése, 2005. június 2-4. Budapest

3. **Vigh É**. A makrofág migráció inhibitor faktor: a gyulladásgátló intervenció egy új célpontja. IV. Országos Interdiszciplináris Grastyán Konferencia, 2006. április 26-28. Pécs

4. Garai J, Molnár V, **Vigh É**, Lóránd T. Természetes polifenolok és szintetikus cikloalkanonok MIF citokin tautomeráz enzimaktivitást gátló hatékonysága. MTA Flavonoidkémiai Munkabizottság tudományos előadójelentése, 2006. december 1. Budapest
5. **Vigh É**, Garai J. Valóban veszélyesek a környezetszennyezéssel élelmiszereinkbe jutó álhormonok? A CASCADE EU program bemutatása. Étrend-kiegészítők, gyógyhatású termékek, különleges táplálkozási célú élelmiszerek, gyógynövények, vitaminok és gyógyteák „az egészséges táplálkozás és életmód tükrében” IV. Országos Szakmai Konferencia, 2007. február 22-23. Sárvár
6. Garai J, **Vigh É**. Environmentális- phyto- xeno- és egyéb ösztrogének. (V)Edd mi használ, de kerüld mi árt! Étrend-kiegészítők, gyógyhatású termékek, különleges táplálkozási célú élelmiszerek, gyógynövények, vitaminok és gyógyteák „az egészséges táplálkozás és életmód tükrében” IV. Országos Szakmai Konferencia, 2007. február 22-23. Sárvár
7. **Vigh É**. A Makrofág Migráció Inhibitor Faktor enzimaktivitása: egy lehetséges antiinflammatorikus célpont. Semmelweis PhD Tudományos Napok, 2007. április 12-13. Budapest; A Semmelweis Egyetemi Doktori Iskola 1. díjának elnyerése.
8. **Vigh É**, Garai J. Hungarian mother's milk project. CASCADE 3rd Annual Meeting, 2007. április 17-19. Helsinki, Finnország
9. Schumacher E, **Vigh É**, Bíró Molnár V, Kenyeres P, Fehér G, Késmárky G, Garai J, Tóth K. A kávésav in vivo hemoreológiai és trombocita aggregáció gátló hatásának vizsgálata. 5. Magyar Mikrokeringés Kongresszus, 2007. április 20-21. Balatonkenese
10. Garai J, **Vigh É**. Environmentális- phyto- xeno- és egyéb ösztrogének. (V)Edd mi használ, de kerüld mi árt! Magyar Menopausa Társaság VII. Országos Kongresszusa, 2007. június 7-9. Siófok
11. Schumacher E, Bíró Molnár V, **Vigh É**, Garai J. Cikóriakávé antithrombotikus hatásának vizsgálata in vivo. Magyar Menopausa Társaság VII. Országos

Kongresszusa, 2007. június 7-9. Siófok

12. **Vigh É.** The ongoing Hungarian milk data project in CASCADE. CASCADE WP10/11 Work Meeting, 2007. november 6-7. Stockholm, Svédország

13. Garai J, **Vigh É.** Environmentális- phyto- xeno- és egyéb ösztrogének. (V)Edd mi használ, de kerüld mi árt! Étrend-kiegészítők, gyógyhatású termékek, különleges táplálkozási célú élelmiszerek, gyógynövények, vitaminok és gyógyteák „az egészséges táplálkozás és életmód tükrében” V. Országos Szakmai Konferencia, 2008. március 6-8. Bükfürdő

14. **Vigh É,** Garai J. Környezeti ösztrogének és antiösztrogének funkcionális élelmiszerekben, étrend-kiegészítőkben, ételszennyezőkben. Magyar Táplálkozástudományi Társaság XXXIII. Vándorgyűlése, 2008. október 2-4. Pécs

15. Garai J, **Vigh É.** Környezeti ösztrogének és antiösztrogének funkcionális élelmiszerekben, étrend kiegészítőkben, gyógynövényekben és étel szennyezőkben. A gyógynövénykutatás új eredményei, minőség, hatékonyság és megbízhatóság a gyógynövények alkalmazásában, Gyógynövény Szimpózium, 2008. október 16-18. Pécs

16. Håkansson H, **Vigh É,** Berglund M, Colombo A, Benfenati E, Garai J. Breast milk consumption and POPs exposure - A joint CASCADE project, which illustrates the benefits of building European networks. CASCADE Partner Meeting, 2008. december 2-3. Brüsszel, Belgium

17. **Vigh É.** Újszülöttek dioxin expozíciójának vizsgálata. VII. Országos Interdiszciplináris Grastyán Konferencia, 2009. március 23-25. Pécs

18. **Vigh É,** Colombo A, Benfenati E, Bódis J, Berglund M, Håkansson H, Garai J. Perzisztens szennyezőanyagok az anyatejben. A CASCADE NoE EU-FP6 projekt anyatej programja. Étrend-kiegészítők, gyógyhatású termékek, különleges táplálkozási célú élelmiszerek, gyógynövények, vitaminok és gyógyteák „az egészséges táplálkozás és életmód tükrében” VI. Országos Szakmai Konferencia, 2009. március 26-27. Bükfürdő

19. **Vigh É**, Colombo A, Benfeneati E, Håkansson H, Berglund M, Garai J. Perzisztens szerves vegyületek jelenlétének vizsgálata magyar anyatejmintákban. Semmelweis PhD Tudományos Napok, 2009. március 30-31. Budapest; A Semmelweis Egyetemi Doktori Iskola 1. díjának elnyerése.

20. Garai J, **Vigh É**, Lóránd T. A makrofág migráció inhibitor faktora (MIF) alias a *mindennél izgalmasabb faktor*. Magyar Élettani Társaság LXXIII. Vándorgyűlése, 2010. június 16-18. Szeged

21. Párniczky A, Solymár M, **Vigh É**, Miseta A, Németh Á, Lenkey Zs, Szabados S, Cziráki A, Koller Á. A perikardiális folyadék összetétele koszorúér revaszkularizációs műtéten (CABG) és műbillentyű beültetésen átesett (VR) betegekben. Magyar Kardiológusok Társasága 2011. évi Tudományos Kongresszusa, 2011. május 11-14. Balatonfüred

22. Garai J, **Vigh É**, Lóránd T. Makrofág migráció inhibitor faktora (MIF): a cytokinek doayenje továbbra is egy módfelett izgalmas faktor. FAME 2011, 2011. június 8-11. Pécs

Konferencia poszterek:

1. **Vigh É**, Gabrieli P, Schumacher E, Bíróné Molnár V, Garai J. Gyulladásgátló molekulák hatása a migráció inhibitor faktor enzimaktivitására és a tubulin polimerizációra. Magyar Élettani Társaság LXIX. Vándorgyűlése, 2005. június 2-4. Budapest

2. Garai J, Molnár V, **Vigh É**, Zámbó K, Schmidt E, Hock M, Bódis J. Dietary intervention in menopausal prevencion. 4th International GM and 2nd PSN Meeting of Functional Foods, 2007. március 26-27. Budapest

3. Garai J, **Vigh É**, Molnár V. Is paracetamol a potencial endocrine disruptor? CASCADE 3rd Annual Meeting, 2007. április 17-19. Helsinki, Finnország

4. **Vigh É**, Schumacher E, Bíróné Molnár V, Kenyeres P, Fehér G, Garai J. A cikóriakávé fogyasztás hatása a szérum MIF szintekre, a haemorheológiai paraméterekre és a thrombocyta aggregációra. Magyar Élettani Társaság LXXI. Vándorgyűlése, 2007. június 6-8. Pécs
5. **Vigh É**, Molnár V, Benfenati E, Berglund M, Håkansson H, Garai J. Breast milk intake of exclusively breastfed infants from 1 to 13 weeks. CASCADE 4th Annual Meeting, 2008. május 5-7. Brüsszel, Belgium
6. Garai J, Schumacher E, **Vigh É**, Molnár V, Kenyeres P, Fehér G, Késmárky G, Tóth K. Hemorheologic and thrombosis preventive potential of chicory coffee consumption: a clinical study. 25th Conference of the European Society for Microcirculation, 2008. augusztus 26-29. Budapest
7. **Vigh É**, Colombo A, Benfenati E, Bódis J, Berglund M, Håkansson H, Garai J. Are there harmful PCBs in Hungarian breast milk? CASCADE Open Forum 2008, 2008. október 2. Brüsszel, Belgium
8. **Vigh É**, Colombo A, Benfenati E, Håkansson H, Berglund M, Garai J. Környezeti szennyezők expozíciójának rizikója a szoptatási időszak alatt. Semmelweis PhD Tudományos Napok, 2009. március 30-31. Budapest
9. Garai J, Schumacher E, **Vigh É**, Molnár V, Kenyeres P, Fehér G, Késmárky G, Tóth K. Hemorheologic and thrombosis preventive potential of chicory coffee consumption: a clinical study. NutrEvent, 2009. június 17-18. Lille, Franciaország
10. **Vigh É**, Garai J, Colombo A, Benfenati E, Håkansson H, Berglund M. Exposure assessment of breastfed infants in Hungary to persistent organic pollutants. NutrEvent, 2009. június 17-18. Lille, Franciaország
11. **Vigh É**, Bódis J, Garai J. Makrofág migráció inhibitor faktor jelenlétének vizsgálata anyatejben a szoptatási időszak első 3 hónapjában. Magyar Élettani Társaság LXXIII. Vándorgyűlése, 2009. augusztus 27-29. Budapest

12. **Vigh É**, Colombo A, Benfenati E, Håkansson H, Berglund M, Garai J. Anyatejjel táplált magyar újszülöttek POP expozíciójának vizsgálata. Magyar Élettani Társaság LXXIII. Vándorgyűlése, 2009. augusztus 27-29. Budapest
13. **Vigh É**, Gabrieli P, Schumacher E, Molnár V, Garai J. Phytoestrogens and other plant phenols affect Macrophage migration inhibitory factor enzymatic activity and tubulin polymerization. Tenth Anniversary Meeting on Environment and Hormones (E.Hormone 2009), 2009. október 20-24. New Orleans, LA, USA
14. **Vigh É**, Colombo A, Benfenati E, Håkansson H, Berglund M, Bódis J, Garai J. Exposure assessment of breastfed infants to persistent organic pollutants in Hungary. Tenth Anniversary Meeting on Environment and Hormones (E.Hormone 2009), 2009. október 20-24. New Orleans, LA, USA
15. Németh Á, Lenkey Zs, Ajtay Z, Cziráki A, Sulyok E, Horváth I, Szabados S, **Vigh É**, Martens-Lobenhoffer J, Awiszus F, Bode-Böger SM. Stent implantáció hatása a koszorúérbetegek aszimmetrikus dimetilarginin (ADMA) szintjére akut miokardiális infartus után. Magyar Kardiológusok Társasága 2010. évi Tudományos Kongresszusa, 2009. május 5-8. Balatonfüred
16. **Vigh É**, Schumacher E, Bíró Molnár V, Kenyeres P, Fehér G, Késmárky G, Tóth K, Garai J. Cikóriakávé: egy trombólispreventív ital? Magyar Élettani Társaság LXXIII. Vándorgyűlése, 2010. június 16-18. Szeged
17. **Vigh É**, Schumacher E, Bíró Molnár V, Kenyeres P, Fehér G, Késmárky G, Tóth K, Garai J. Cikóriakávé: egy trombólispreventív ital? Magyar Táplálkozástudományi Társaság XXXV. Vándorgyűlése, 2010. szeptember 30.- október 2. Balatonőszöd