Stressz-indukálta metabolikus, bél mikrobiom és viselkedés változások

Doktori tézisek

Kuti Dániel

Semmelweis Egyetem
Szentágothai János Idegtudományi Doktori Iskola

Témavezető: Dr. Kovács Krisztina, DSc., tudományos tanácsadó

Hivatalos bírálók: Dr. Vásárhelyi Barna, MD, D.Sc., egyetemi tanár
Dr. Halász József, Ph.D., egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Dobolyi Árpád, DSc., tudományos főmunkatárs

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Patócs Attila, MD, D.Sc., egyetemi docens
Dr. Tóth Máté, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Budapest
2020

Bevezetés

A külső és belső kihívások hormonális, metabolikus és viselkedésbeli válaszokat indítanak, amelyek célja a szervezet homeosztázisának helyreállítása. Stressz során aktiválódik a szimpatikus idegrendszer, és a hipotalamusz-hipofízis-mellékvesekéreg (HPA) – tengely. A megküzdés akkor hatékony, ha a stressz-válasz szükség esetén gyorsan aktiválódik, és lezárul, ha a potenciális veszélyeztető ágens már nincs jelen. A stressz-válasz során kialakult új egyensúlyi állapotot allosztázisnak nevezzük. Ha a stressz-válasz nem megfelelő, túlzott vagy elhúzódó, illetve ha a szervezetet folyamatosan érik a különböző stresszorok, akkor az egyensúly helyreállításának már olyan magas lesz a „költsége" a szervezet számára, hogy az metabolikus-, immun-, pszichiátriai betegségekhez vezethet.

A stresszorok négy kategóriába sorolhatók, fizikai; pszichogén; szociális; metabolikus stresszorok. Az időtartam alapján a stresszorok akut- vagy krónikusak lehetnek. A stressz-válasz során, gyorsan ható ágensek (mint pl. katekolaminok, neuropeptidek) és lassabb hatású, génexpressziót szabályozó kortikoszteroidok hozzájárulnak a megfelelő válasz kialakításához, amelyek fokozott éberséget, fókuszált figyelmet alakítanak ki, valamint növelik a glukoneogenezis, glikogenolízis, proteolízis vagy lipolízis mértékét, így biztosítva a kiemelten fontos szervek energia ellátását. A kortikotropint felszabadító hormont (CRH)-t a hipotalamusz paraventrikuláris magjának (PVN) parvocelluláris neuronjai termelik. A CRH nélkülözhetetlen a neuroendokrin stressz-válasz elindításában és az adekvát viselkedés, valamint a metabolikus válasz kialakításában. Számos afferens pálya serkenti a CRH neuronokat PVN-ben, mint felszálló agytörzsi pályák, melyek a viszceroszenzoros ingereket közvetítik, míg a pszichogén stresszorok hatását komplex limbikus útvonal mediálja. A metabolikus, tápanyaggal kapcsolatos információk PVN neuronjait direkt módon vagy a hipotalamikus arcuatus magja felől érik el.

A hipotalamusz arcuatus magja két fő idegsejt populációt tartalmaz, amelyek a szervezet energia-egyensúlyát szabályozzák. Az orexigén neuronok neuropeptid Y-t és agouti related peptid (NPY/AgRP), az anorexigén neuronok pro-opiomelanocortint és a 'kokain és amfetamin által szabályozott transzkript' expresszálnak (POMC/CART). Ezek az idegsejtek olyan transzportereket, receptorokat fejeznek ki, amivel képesek az

energia-háztartással kapcsolatos tápanyagokat (glükóz, szabad zsírsavak), hormonokat (leptin, inzulin, ghrelin) érzékelni, és az információt továbbítani a PVN neuronjaihoz.

A mikrobiom a mikroorganizmusok komplex és dinamikus keveréke. Ez a baktériumokból, gombákból és egyéb mikroorganizmusokból álló közösség folyamatos kölcsönhatásban van a gazdaszervezettel és így képesek befolyásolni a szervezet legkülönfélébb funkcióit. A mikrobiom összetétele szintén formálódik a gazdaszervezet által és folyamatosan változik különböző tényezők hatására. Ilyen tényezők például a születés módja, a szoptatás, az étrend, a stressz, az öregedés, különböző gyógyszerek (pl. antibiotikumok) stb. A mikrobiom és a szervezet között kétirányú kölcsönhatás lehet közvetett és közvetlen. A bél mikrobiom különböző metabolitokat képes termelni, mint például rövid szénláncú zsírsavak (SCFA), vitaminok, vagy különböző neurotranszmitterek és azok prekurzorai, amelyek befolyásolhatják helyileg az enterikus idegrendszert vagy szisztémásan fejtik ki hatásukat. A mikrobiom közvetett hatását a nervus vagus mediálja vagy a bél agy kommunikáció a bélben lévő immunsejtek citokin termelésen keresztül valósul meg.

Alapesetben egy harmonikus szimbiózis áll fenn a gazdaszervezet és a bél mikrobiom között, ami előnyös mind a két fél számára. Azonban, különböző tényezők hatására diszbiózis alakulhat ki a mikrobiomban. A patogén baktériumok felszaporodnak és a kommenzalista baktériumok száma lecsökken. Ezek a folyamatok a bél barrier hanyatlásához vezet. Ennek hatására a bél permeabilitása megnő és így a pathogén baktériumok vagy nagyobb molekulák, mint például a Gram pozitív baktériumok sejtfalából származó lipopoliszacharidok (LPS) is átjuthatnak a bél barrieren. Több kísérlet is bizonyította, hogy a krónikus stressz diszbiózist indukálhat a bél mikrobiomban és gerjeszti az „áteresztő bél” szindróma kialakulását. Ezek a folyamatok tovább súlyosbíthatják különböző kórképek kialakulását. A bél mikrobiom diszbiózist több neurológiai/pszichiátriai betegséggel, mint például az autizmussal, a szorongásos kórképekkel, a depresszióval, skizofrénia és neurodegeneratív betegséggel, mint Alzheimer és Parkinson betegséggel hozták összefüggésbe.

Célkitűzések

Első célkitűzésem a stressz hatás vizsgálata volt a metabolikus rendszerre. Ezért, a konkrét kérdéseim a következők voltak:

- Akut stressz hogyan befolyásolja a metabolikus rendszert és a lokomotoros aktivitást?
- Milyen szerepe van a CRH^{PVN} neuronoknak a metabolikus változások szabályozásában?
- Milyen metabolikus változások figyelhetők meg krónikus stressz után?
- A krónikus stressz utáni felépülés szakaszában milyen metabolikus változások figyelhetők meg?

Második célkitűzésként azt vizsgáltam, hogy a krónikus stressz milyen változást indukál az egér mikrobiomban és teszteltem azt a hipotézist, hogy rifaximin – nem felszívódó antibiotikum – kezelés hatására helyre állnak-e a stressz-indukálta gasztrointesztinális és gyulladásos változások és a mikrobiom változáson keresztül csökken-e a stressz okozta szorongásos viselkedés.

Harmadszor, epidemiológiai adatok elemzésével azt vizsgáltuk, hogy kimutatható-e összefüggés a szisztémás antibiotikum fogyasztás okozta bél diszbiózis és a Parkinson kór prevalenciája között.

Módszerek

Kísérleti állatok

Kísérleteimet hím, C57BL/6 genetikai hátterű egereken végeztem. CRH-Ires-Cre transzgenikus egér törzset használtam a kemogenetikus kísérletekhez.

Intracerebrális injektálások

CRH-IRES-Cre transzgenikus egereket elaltattuk, majd pAAV8/hSyn-DIO-hM3D(Gq)-mCherry tartalmazó vírus konstruktot injektáltunk sztereotaxissal a mindkét oldali paraventricular nucleus (PVN)-ba. A kontroll állatoknak pAAV-hSyn-DIO-

mCherry vírus konstruktot injektáltunk. Az egereket a műtét után 3 héttel vizsgáltuk tovább.

Stressz protokolok

- *Akut pszichogén stressz – restraint (mozgáskorlátozás)*

Restraint stressz során átlátszó, jól szellőző Falcon csövekbe helyeztük az állatokat 1 órán keresztül. Az eljárás során az állatok a szűk helyből fakadóan mozgásukban erősen korlátozva voltak, ami pszichogén stresszként hatott rájuk, de fizikai sérülést nem szenvedtek.

- *Krónikus variábilis stressz (CVS)*

A CVS közben a kísérleti állatok 4 hétig voltak stresszelve naponta kétszer, különböző stresszorokkal (szociális vereség, víz elkerülés stressz, világosság/sötétség váltása, erőltetett úszás, vizes alom, dőlt ketrec, izoláció, zsúfoltság, rázatás, restraint, áramütések, patkány ürülék szag).

- *Krónikus pszichogén stressz – „két csapás" stressz protokoll*

A két csapás stressz protokollban kombináltuk a korai élet során elszenvedett megpróbáltatásokat (anyai szeparáció –maternal separation, MS) és a felnőttkori krónikus variábilis stresszt (CVS). Az anyai szeparáció során az utódokat születésük utáni 1-12 napos korukban, napi 3 órán keresztül az anyaállattól elválasztva tartottuk. A kontroll állatokat posztnatalisan nem szeparáltuk, és felnőtt korukban sem zavartuk.

Rifaximin kísérlet

CVS közben az állatok felét egy nem felszívódó antibiotikummal, rifaximinnel kezeltük, 300 mg/ttkg/nap dózisban. Az 5% hipromellóz oldatban oldott rifaximint az állatok az itatójukon keresztül kapták. A folyadék bevitelt és az állatok testtömegét a kísérlet közben monitoroztuk, és a rifaximin koncentrációt ennek megfelelően számoltuk.

Metabolikus paraméterek vizsgálata

Az egerek egyesével voltak elhelyezve TSE Phenomaster ketrecekben és a metabolikus paraméterek indirekt kalorimetriával voltak mérve. A testtömeg összetételt (zsírtömeg és soványtömeg) pedig MRI-vel határoztuk meg.

Viselkedés tesztek

Krónikus variábilis stresszelt állatok viselkedését etogram, nyílt tér teszt, emelt keresztpalló teszt és cukor preferencia tesztben vizsgáltuk. A viselkedés teszteket videóval rögzítettem és később Solomoncoder-el, ill. EthoVision XT szoftverrel elemeztem ki. A metabolikus mérések közben a lokomotoros viselkedés automatikusan volt detektálva a TSE Phenomaster rendszerben.

Bél permeabilitás teszt in vivo

Egész éjszakás éheztetés után, az állatok fluoreszcensen jelölt 4kDa-os Dextránt kaptak gyomor szondán keresztül. Két órával a szívből vett vérmintából fluoreszcencia intenzitást Cytation 5 Cell Imaging Multimode műszerrel (gerjesztés – 485nm, kibocsátás – 535nm).

Epidemiológiai adtok gyűjtése

Adatokat az ESAC (European Surveillance of Antibiotic Consumption network) és az ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) projektből gyűjtöttük, majd korrelációt számoltunk az egyes antibiotikumok fogyasztása és a Parkinson betegség prevalenciája között.

Plazma analízisek

- Plazma endotoxin szintet limulus amebocyte lysate (LAL) Kit segítségével detektáltuk.
- Plazma glükóz szintet Glucose Colorimetric Detection Kit-el mértük le.
- Plazma triglicerid szintet multiparameter diagnosztikus eszközzel határoztuk meg.

- Plazma kortikoszteron koncentrációt radioimmunoassay (RIA) módszerrell mértük.

Mikrobiom analízis

Mikrobiom analízishez a bakteriális 16S riboszómális RNS-t kódoló génszakaszokat kvantitatív real-time PCR módszerrel mértük. A baktériumok detektálásához taxon specifikus 16S riboszómális RNS primereket használtunk.

Génexpressziós analízis

A génexpressziós változások detektálásához szintén RT-PCR-t használtunk. A szövetmintákból RNS-t izoláltunk, majd cDNS szintézis után a target gének egyes szakaszaira tervezett primer párokat használtuk a rt-PCR reakcióban.

Hisztológiai analízis

Hisztológiai analízist agyszövet szeleteken és parafinba ágyazott vastagbélszöveteken végeztük. Az agyszöveteken c-fos fluoreszcens immunhistokémiát (IHC), a vastagbél szöveteken hemotoxilin-eozin festést és makrofág marker (F4/80) IHC-t végeztünk. A képeket ImageJ software segítségével elemeztünk.

Statisztikai analízis

Statisztikai analízist GraphPad Prism software-el végeztük. Az elemzésekhez kétutas és egyutas ANOVA-t használtunk a megfelelő post hoc tesztel. Ahol kísérlet önkontrollos volt ott ismételt méréses ANOVA-t használtunk. Két csoport esetén a szignifikancia meghatározásához párosítatlan kétoldalú t-tesztet használtunk.

Eredmények

Pszichológiai akut stressz hatása a metabolizmusra és a lokomotoros viselkedésre

A stresszelt állatok emelkedett lokomotoros aktivitást mutattak a stressz utáni első órában. A világos napszakban az állatok átlagos mozgás aktivitása nem változott, azonban a sötét napszakban szignifikáns csökkenés volt megfigyelhető. Továbbá, a stresszelt állatok többet ettek az első négy órában, és a harmadik órától volt szignifikáns különbség megfigyelhető az alapmérés és az akut stressz utáni mérés

között. Azonban ez a különbség később kiegyenlítődött és a kumulatív táplálék felvétel nem változott sem a sötét sem a világos napszakban. Magasabb energia felhasználás (EE) volt megfigyelhető az akut stressz után az első négy órában és szintén szignifikáns emelkedés volt megfigyelhető az egész világos napszakban az alapmérésekhez képest, azonban a sötét napszakban nem volt különbség. A légzési hányados nem változott akut stressz után, valamint csökkent testtömeg és zsírtömeg volt megfigyelhető 24 órával az akut stressz után.

CRH^{PVN} aktivitásának hatása a metabolizmusra és a lokomotoros viselkedésre

Lokomotoros aktivitás nem változott a CRH^{PVN} neuronok aktivitása után. Az átlagos kumulatív táplálék felvétel szignifikánsan magasabb volt az első négy órában a CNO injekció után. A teljes világos napszakot vizsgálva, nem volt különbség a táplálék felvételben, azonban szignifikáns csökkenés volt megfigyelhető a sötét napszakban. Az energia felhasználás emelkedett CNO beadás után az első négy órában. A légzési hányadosban az egész vizsgált periódusban nem volt változás. Testtömeg és a zsírtömeg szignifikánsan csökkent, a soványtömeg nem változott a mérés végére.

Krónikus variábilis stressz (CVS) hatása a metabolizmusra

A krónikusan stresszelt egerek lokomotoros aktivitása szignifikánsan magasabb volt a világos napszakban, azonban a sötét napszakban szignifikáns változás nem volt megfigyelhető. A stresszelt állatok táplálék fogyasztása nagyobb volt a CVS után, de szignifikáns különbség csak az aktív napszakban volt megfigyelhető. A kumulatív táplálékfogyasztás emelkedett maradt a felépülés alatt a kontroll állatokhoz képest, de ez a változás már nem volt szignifikáns. A krónikusan stresszelt állatok energia felhasználása magasabb volt a három napos metabolikus mérés alatt a kontroll állatokhoz képest és a felépülés alatt az átlagos energia felhasználás szignifikánsan csökkent az aktív napszakban a stresszelt állatokhoz képest. A metabolikus mérés közben a légzési hányados folyamatosan magasabb volt a stresszelt állatokban a CVS után, azonban a stresszelt állatok átlagos légzési hányadosa lecsökkent két nap után a kontroll szintre, de ez csak a világos napszakban volt megfigyelhető. A testtömegben nem volt különbség megfigyelhető a stresszelt és a kontroll állatok között a mérés

elején. Azonban zsírtömeg szignifikánsan csökkent, míg a soványtömeg szignifikánsan emelkedett volt a krónikusan stresszelt állatokban. A felépülés alatt zsír- és soványtömeg normalizálódott a kontroll szintre és a testtömeg szignifikánsan emelkedett.

A krónikus stressz hatása a bél mikrobiomra és annak helyreállítása rifaximin (nem felszívódó antibiotikum) kezelés után

Ebben a kísérletsorozatban az un. „két csapás stressz" protokollt használtuk. Ebben a protokollban az első csapást a kölyköknek az anyától napi 4 órára való elválasztása jelenti, a születés utáni 1-14 nap között (maternal separation, MS). A második csapás pedig a felnőtt korban végzett, négy hetes krónikus. variábilis stressz (CVS). Az MS+CVS protokoll szignifikánsan csökkentette a vastagbél tartalomban mért (bakteriális) DNS mennyiségét, ami csökkent baktérium számra utal. Vastagbél mikrobiom diverzitását phylum szinten analizáltuk és az eredmények emelkedett *Bacteroidetes* és *Proteobacteria* mennyiséget mutattak. *Clostridium sp*. mennyiség szintén szignifikáns emelkedést mutatott krónikus stressz után. Rifaximin kezelés visszaállította *Proteobakteria* mennyiséget és a kontroll szintre csökkentette a *Clostridium sp*. mennyiséget krónikusan stresszelt állatokban.

Rifaximin hatása a krónikus stressz-indukálta viselkedés változásokra

A krónikus stressz és rifaximin kezelés hatását vizsgáltuk az egerek viselkedésére, etogram felvételével. Négy különböző viselkedés elem (mozgás, keresés, ágaskodás és mosakodás) előfordulási gyakoriságát vizsgáltuk az állatok új környezetbe helyezését követő öt perces időintervallumban. Az MS+CVS protokollnak kitett egerek hiperlokomotoros viselkedést mutattak a kontroll állatokhoz képest. Mind a négy viselkedés elem sűrűsége emelkedett volt. A teljes sétálással, ágaskodással és mosakodással töltött idő szignifikánsan magasabb volt, azonban a keresés időtartalma alacsonyabb volt. Hasonlóan megemelkedett mozgási aktivitást észleltünk a nyílt tér teszt közben, továbbá kevesebb időt töltöttek a centrumban, és az első belépés a szélekre korábban történt a krónikusan stresszelt állatoknál. Az emelet palló teszt közben az stresszelt állatok preferenciája a nyílt kar felé alacsonyabb volt. MS+CVS-nek kitett egerek cukor fogyasztása szignifikánsan alacsonyabb volt a cukor

preferencia teszt közben. A stresszelt állatok rifaximin kezelése sem a lokomotoros aktivitást sem a szorongásos viselkedést nem változtatta meg.

MS+CVS Rifaximin kezelés és hatása a bélre és a bél immunrendszerére.

MS+CVS szignifikánsan csökkentette a vastagbélben a nyálkahártya vastagságot a kontrollokhoz képest. Ez a különbség nem volt megfigyelhető a rifaximinnel kezelt csoportokban. 'Tight junction' fehérjék, mRNS expressziós szintje indukálódott mindkét rifaximinnel kezelt csoportban és változatlan maradt krónikus stressz hatásra. Reg3b (antimikrobiális peptid) expressziója hatszorosára emelkedett az MS+CVS-nek kitett egerek vastagbelében, a rifaximin kezelés helyreállította ezt a növekedést. Fluoreszcens 4kDa-os dextránnal vizsgáltuk *in vivo* a bél áteresztőképességét. Krónikus stressz hatására emelkedett a permeábilitás, míg rifaximin kezelésre kivédte ezt a hatást. Krónikus stressz hatására több F4/80 pozitív makrofág sejt vándorolt a lamina propriába, és ezt a hatást a rifaximin kezelés kivédte. A krónikus stressz bakteriális beszűrődést eredményezett a mezenterikus nyirokcsomókba, melyet a rifaximin kezelés kivédett. A krónikus stressz hatására a plazma LPS szintje is emelkedett, jelezve az áteresztő bél tünetegyüttes kialakulását. A rifaximin kezelés ezt a hatást is sikeresen kivédte.

Hipotézis: Korreláció a Parkinson betegség prevalenciája, bizonyos antibiotikumok fogyasztása, és a bél mikrobiom diszbiózisa között.

Szisztémás antibiotikum jelentősen befolyásolhatja a mikrobiomot, és így krónikus diszbiózist okozhat a bélben, amely neurológiai betegségek kifejlődését indukálhatja. Például a Parkinson betegség gyakran gasztorintesztinális tűnetekkel társul. Parkinson betegekben a diszbiózis kedvez a curli fehérje termelő *Enterobacteria* elszaporodásához. A Curli fehérje egy bakteriális α-szinuklein (α-syn), amely első lépésben az enetrikus idegrendszerben rakodhat le, majd ezek az amiloid depozitok prionokhoz hasonló módon tovább terjednek a központi idegrendszerbe. Hipotézisünkben vizsgáltuk, vajon van-e összefüggés különféle antibiotikum csoportok fogyasztása miatt kialakuló esetleges diszbiózis és a Pakinson kór prevalenciája közt, európai országokban gyűjtött epidemiológiai adatok felhasználásával. Az eredmények szignifikáns pozitív korrelációt mutattak a szűk

spektrumú + penicilináz (β-lactamase) reszisztens penicillin fogyasztás és a PD prevalencia növekedése között.

Következtetések

- Az akut pszichogén stressz nagymértékben befolyásolja a metabolikus rendszert, az energiafelhasználást és a táplálék fogyasztást, valamint a lokomotoros aktivitást.
- A hipotalamusz paraventrukularis magja részét képezi egy olyan neuronális hálózatnak, amely az akut stressz hatást közvetíti az anyagcsere és az aktivitás szabályozásban.
- A krónikus stressz jelentős, hosszan tartó változásokat okoz a testtömeg összetételben és az anyagcserében. A táplálékfogyasztás, az energia felhasználás és a légzési hányados is magasabb krónikus stressz után. Ezek a krónikus stressz-indukálta változások különböző regenerálódnak a stressz megszűnése után.
- Rifaximin kezelés (nem felszívódó antibiotikum) helyreállítja a krónikus stressz okozta mikrobiom diszbiózist, a megnövekedett bél permeabilitást és az immunológiai változásokat a bélben. Azonban a krónikus stressz indukálta viselkedésváltozásokra nincs hatással.
- Erős korrelációt találtunk bizonyos antibiotikumok fogyasztása és a Parkinson kór prevalenciája között.

Kezelés	**Lokomotoros viselkedés**	**Táplálék-fogyasztás**	**Energia felhasználás**	**Légzési hányados**	**Test-tömeg**	**Zsír-tömeg**	**Sovány-tömeg**
Akut stressz	↑	↑	↑	-	↓	↓	-
CRH^{PVN} neuronok ingerlése	-	↑	↑	-	↓	↓	-
Krónikus stressz	↑	↑	↑	↑	-	↓	↑

Saját publikációk

Ph.D. disszertációhoz tartozó publikációk

Kuti D; Winkler Z; Horvath K; Juhasz B; Paholcsek M; Stagel A; Gulyas G; Czegledi L; Ferenczi S; Kovacs K.J. Gastrointestinal (Non-systemic) Antibiotic Rifaximin Differentially Affects Chronic Stress-induced Changes in Colon Microbiome and Gut Permeability without Effect on Behavior. BRAIN BEHAVIOR AND IMMUNITY 84 pp. 218-228., 11 p. (2020)

Ternak G; Kuti D; Kovacs KJ. Dysbiosis in Parkinson's Disease might be Triggered by Certain Antibiotics. MEDICAL HYPOTHESES 137 Paper: 109564, 5 p. (2020)

Winkler Z; Kuti D; Ferenczi S; Gulyas K; Polyak A; Kovacs KJ Impaired microglia fractalkine signaling affects stress reaction and coping style in mice. BEHAVIOURAL BRAIN RESEARCH 334 pp. 119-128., 10 p. (2017)

Egyéb publikációk

Vas V; Hahner T; Kudlik G; Ernszt D; Kvell K; Kuti D; Kovacs KJ; Tovari J; Trexler M; Mero BLAnalysis of Tks4 Knockout Mice Suggests a Role for Tks4 in Adipose Tissue Homeostasis in the Context of Beigeing. CELLS 8 : 8 Paper: 831 , 20 p. (2019)

Winkler Z; Kuti D; Polyak A; Juhasz B; Gulyas K; Lenart N; Denes A; Ferenczi S; Kovacs KJ Hypoglycemia-activated Hypothalamic Microglia Impairs Glucose Counterregulatory Responses. SCIENTIFIC REPORTS 9:1 Paper: 6224, 14 p. (2019) 3.

Polyak A; Winkler Z; Kuti D; Ferenczi S; Kovacs KJ Brown adipose tissue in obesity: Fractalkine-receptor dependent immune cell recruitment affects metabolic-related gene expression. BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA-MOLECULAR AND CELL BIOLOGY OF LIPIDS 1861:11 pp. 1614-1622., 9 p. (2016)

Kriszt R; Winkler Z; Polyak A; Kuti D; Molnar C; Hrabovszky E; Kallo I; Szoke Z; Ferenczi S; Kovacs KJ Xenoestrogens Ethinyl Estradiol and Zearalenone Cause Precocious Puberty in Female Rats via Central Kisspeptin Signaling.ENDOCRINOLOGY 156 : 11 pp. 3996-4007., 12 p. (2015)