



SZENT ISTVÁN EGYETEM

**HAGYOMÁNYOS VÍZTISZTÍTÁSI TECHNOLÓGIÁK SORÁN
VISSZAMARADÓ MELLÉKTERMÉK VEGYÜLETEK
VIZSGÁLATA HALMODELLEN**

Doktori értekezés tézisei

Bencsik Dóra

Gödöllő

2019

A doktori iskola

Megnevezése: Állattenyésztés-tudományi Doktori Iskola

Tudományága: Állattenyésztési-tudomány

Vezetője: Dr. Mézes Miklós

egyetemi tanár, az MTA rendes tagja
Szent István Egyetem, Mezőgazdaság- és
Környezettudományi Kar, Állattudományi Alapok
Intézet, Takarmányozástani Tanszék

Témavezető: Dr. Csenki-Bakos Zsolt Imre

tudományos munkatárs, PhD
Szent István Egyetem, Mezőgazdaság- és
Környezettudományi Kar, Akvakultúra és
Környezetbiztonsági Intézet, Halgazdálkodási
Tanszék

Társtémavezető: Dr. Urbányi Béla

egyetemi tanár, az MTA doktora
Szent István Egyetem, Mezőgazdaság- és
Környezettudományi Kar, Akvakultúra és
Környezetbiztonsági Intézet, Halgazdálkodási
Tanszék

.....
A doktori iskola vezetőjének jóváhagyása

.....
A témavezető jóváhagyása,

.....
A társtémavezető jóváhagyása

1 A munka előzményei, kitűzött célok

1.1 A munka előzményei

A víz a földi lét alapja, valamint az emberiség fejlődésének mozgatórugója. Ezzel együtt azonban egyre nő az emberiség vízigénye, viszont az ipari és társadalmi fejlődés komoly károkat okozott a Föld vízkészletében. Talán pont a nagymértékű fejlődésnek, iparosodásnak köszönhetően egyre nehezebb megfelelő minőségű és mennyiségű ivóvízhez jutni.

A világ különböző területein élő emberek eltérő, ivóvízzel kapcsolatos problémákkal néznek szembe. A fejlődő országok lakói küzdenek az éhínséggel, hiszen víz hiányában nem tudnak elegendő élelmiszert előállítani. A vízhiány mellett hatalmas probléma a rendelkezésre álló vízforrások szennyezettsége is. Számos betegség (malária, tífusz, szalmonellózis, hepatitisz, *Escherichia coli* fertőzés) szedi áldozatát ezen országokban, mert nem állnak rendelkezésre a megfelelő higiéniai körülmények. A biológiai veszélyforrások mellett ezekben az országokban az ipari szennyezés is számottevő, a laza vagy éppen be nem tartott környezetvédelmi előírások miatt.

A fejlett országokban a vízforrások rendelkezésre állnak ugyan, de napjaink modern életvitelének köszönhetően el is szennyeződnek. Ezekben a területeken az ipar és a mezőgazdaság a két legjelentősebb szennyező forrás. Fontos megemlíteni, hogy a háztartásokból is számos szennyezőanyag kerül környezetünkbe. Ezen anyagok eltávolítására, valamint a vízzel terjedő betegségek megelőzésére különböző víztisztítási procedúráknak vetik alá a települések szennyvizét és az ivóvíz előállítás során a nyersvizet.

A víztisztítás során keletkező melléktermék vegyületek (DBP- *disinfection by-product*) jelenlétére és vizsgálatának fontosságára először a holland vegyész, Johannes Rook munkássága irányította a figyelmet. Az elmúlt néhány évtizedben több, mint 600 anyagról derült ki, hogy a vízkezelés során keletkezik, ezeknek azonban csak töredékéhez rendeltek határértéket a hatályos szabályozásokban (98/83/EK rendelet, 201/2001. (X.25.) Kormányrendelet, EPA 63 FR 69390), számos anyag toxikológiai vonatkozásairól a mai napig nem áll rendelkezésünkre elegendő információ.

Bár az elmúlt években számos publikáció jelent meg a DBP-vel kapcsolatban, még mindig kevés figyelmet kap ez a témakör. Ennek számos oka lehet, például az, hogy kémiaiag nagyon sokféle vegyület sorolható ebbe a csoportba, nagyon alacsony koncentrációban található meg a természetes vízbázisokban és az ivóvízben, így nehéz a kimutatásuk, még a mai, modern

analitikai módszerek alkalmazásával is. A kezeletlen ivóvízzel szemben, mely számos betegség terjesztője lehet, akut problémát általában nem okoznak sem az élővilágban, sem pedig a fogyasztókban. Igazi veszélyük ebben rejlik, hiszen a káros hatások kialakulásához évek vagy évtizedek is kellhetnek.

A probléma tehát nagyon összetett, kiderült, hogy a vízben található oldott szervesanyag (DOM- *dissolved organic matter*) mellett a korábban a vízbázisba került vegyületekből is kialakulhatnak DBP-k. Ilyenek lehetnek a gyógyszer hatóanyagok, melyek közül számos olyan van, melyet nagy mennyiségben használ a lakosság. Ide sorolhatjuk a hormonális fogamzásgátló készítményeket, csontritkulás elleni szereket és mennyiségüket tekintve a legtöbbit alkalmazott fájdalomcsillapító, gyulladáscsökkentő szereket.

A gyulladáscsökkentő, fájdalomcsillapító készítmények jelentős részéhez vény nélkül kapható készítmények formájában is hozzájuthat a lakosság, így helytelen hulladékkezelés következtében is könnyen bejuthatnak a vizekbe. Világszerte a legnagyobb mennyiségben előállított hatóanyag az ibuprofén (2-(4-izobutilfenil)-propionsav), mely $\mu\text{g/l}$ -es koncentráció tartományban található meg a természetes vizekben. Ami aggasztó ezzel a hatóanyaggal kapcsolatban, hogy bomlástermékeivel együtt megtalálható a szennyvíztisztító telepek elfolyóvizében, szintén $\mu\text{g/l}$ -es koncentráció tartományban. Az anyamolekulából hőközlés, valamint oxidatív kezelés hatására számos bomlástermék keletkezik, köztük a dolgozatban vizsgált 4-etilbenzaldehyd (EBA).

A vegyületről kevésbé ismert tény, hogy az íz- és illatanyagok között megtalálható a vegyszerforgalmazók termékpalettáján, hiszen a mesterséges mandula aromához, a benzaldehydhez hasonlóan, mandula illattal rendelkezik. A benzaldehyddel ellentétben biztonsági adatlapja nem tartalmaz toxikológiai információkat. Az EFSA (*European Food Safety Authority*- Európai Élelmiszerbiztonsági Hatóság) 2012-ben megjelent, az ízesítő anyagokról készült tudományos véleményében nem fogalmaztak meg biztonsági aggályokat az anyaggal kapcsolatban. Azért meglepő mindez, mert ebben a dokumentumban mindössze egy, az EBA toxicitásával kapcsolatos, ám meg sem jelent („*unpublished*”) publikációt említenek. Az EFSA az anyag MSDI (*Maximized Survey- Derived Intake* – maximális számított beviteli érték) értékét $0,37 \mu\text{g/fő/nap}$ -ban határozta meg. Mivel az EBA az egyik leggyakrabban használt gyógyszer hatóanyag, az ibuprofén bomlásterméke, mely szennyvíztisztítás után is megtalálható az elfolyóvízben, ezért kiemelten fontos feltérképezni az élő szervezetekre

gyakorolt hatását. Bár az EFSA megállapított egy MSDI értéket, ám mint az láthatjuk, számos forrásból bejuthat az emberi szervezetbe, így könnyen toxikus hatást fejthet ki.

Dolgozatomban az EBA mellett egy másik DBP vegyületet is vizsgáltam, a 2-4-difluoroanilint (DFA). Ezt az anyagot intermedierként használják gyógyszerek, festékek és növényvédő szerek gyártásakor. Akut esetekben methemoglobinémiát okoz, valamint erősen nefrotoxikus.

Mivel a halak egész életciklusukat a vízben töltik, ezért kiváló modellállatai az ilyen jellegű vizsgálatoknak, a zebradánió pedig egy nemzetközileg elfogadott és jól ismert modellszervezet. Vizsgálataim során, mind az EBA, mind a DFA esetén kiemelten fontosnak tartottam az embriók vizsgálatát, hiszen az anyagok fejlődésbiológiai hatásairól nem áll rendelkezésünkre információ. Ezek a kísérletek jó kiindulópontjai lehetnek humán egészségügyi vizsgálatoknak, kiváltképp a halembriókon végzett microarray vizsgálat, mely az embrionális fejlődés során végbemenő, génexpresszióban bekövetkező változásokat hivatott feltárni.

1.2 Célkitűzések

Munkám célja az volt, hogy megismerjem két víztisztítási melléktermék vegyület, az EBA és a DFA zebradánió embriókra gyakorolt hatásait. Az EBA-ról nagyon kevés információval rendelkezünk, illetve aggasztó, hogy az egyik leggyakrabban használt fájdalomcsillapító hatóanyag, az ibuprofén bomlástermékeként is létrejöhet a vízkezelés során, továbbá íz- és illatanyagként is hozzáférhető. Céлом volt megvizsgálni az EBA és a DFA embriófejlődésre gyakorolt hatásait, valamint meghatározni az akut tesztek során a vegyületek LC (LC_x - *lethal concentration*, az egyedek X%-ának pusztulását okozó koncentráció) értékeit. Továbbá céлом volt az EBA génexpresszióra gyakorolt hatásának vizsgálata microarray assay alkalmazásával. Választ szerettem volna kapni arra, hogy a transzkriptom analízis során kapott eredményt alá tudom-e támasztani különböző, klasszikus toxikológiai vizsgálatokkal, így gyarapítva az EBA-ról rendelkezésre álló toxikológiai információk mennyiségét.

2 Anyag és módszer

2.1 Felhasznált állatok, tartási körülmények és a kísérletek helyszínei

Az akut embrió tesztek, a comet assay-t, valamint a mikronukleusz tesztet és az azokhoz kapcsolódó kezeléseket a Szent István Egyetem Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar, Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet Halgazdálkodási Tanszékén végeztem. A microarray vizsgálatot a Németországban, Lipcsében található Helmholtz Környezetkutató Központban (*Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung – UFZ*) végeztem Dr. Stefan Scholz kutatócsoportjában, a minták elsődleges előkészítését szintén a Halgazdálkodási Tanszéken, illetve a Szent István Egyetem Környezetipari Regionális Tudásközpontjában végeztem.

A kísérletekhez minden esetben AB vonalba tartozó zebradániókat használtam. A halak recirkulációs rendszerben (Tecniplast ZebTec, Tecniplast, Buggugiate, Olaszország). A rendszerben a víz hőmérséklete $25\pm 0,5$ °C-os, a pH $7,5\pm 0,2$, a vezetőképesség 525 ± 50 μ S volt. A halak 14 óra világos, 10 óra sötét fényprogramban voltak tartva. A halak takarmányozása naponta kétszer történt SDS Small Gran (SDS–Special Diets Services Inc.) táppal, élő eleségként hetente kétszer *Artemia spp.* (SERA GmbH.) naupliuszt kaptak.

Az elvégzett vizsgálatok a 1998. évi XXVIII. törvény alapján kiadott "Toxikológiai vizsgálatok halakon" című állatkísérlet végzésére (XIV-I-001/2303-4/2012) vonatkozó engedélyben foglaltak szerint zajlottak.

2.2 Vizsgálatok

2.2.1 Előkísérletek

Mivel sem az EBA, sem pedig a DFA kapcsán nem állt rendelkezésemre zebradánió embriókra vonatkozó akut toxicitás adat, ezért előkísérleteket végeztem az akut tesztek megkezdése előtt, hogy megállapíthassam a megfelelő kezelési koncentrációkat a 120 órás embrió vizsgálatához. A határérték-kereső tesztet mindkét vegyület esetében 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25 mg/l koncentráció sorral hajtottam végre, kontrollként a recirkulációs rendszer vizét használtam. Minden csoportba 20-20 embriót helyeztem, 5 cm-es Petri-csészékbe, 10 ml oldatba. Ezek alapján már be tudtam határolni azt a koncentrációtartományt, mely megfelelőnek bizonyult a 120 órás vizsgálatban az egyes anyagok esetén.

2.2.2 120 órás embrió teszt

Az akut embrió tesztekhez az ikrákat az anyahalak szinkronizált szaporítása után összegyűjtöttem, majd termékenységet sztereó fénymikroszkóp alatt, normál megvilágításban (Leica M205, Leica DFC 425C kamera, LAS V 3.8 szoftver) ellenőriztem. A vizsgálatokat mind a 2-4-difluoroanilin, mind pedig a 4-etilbenzaldehyd esetén az OECD 236: Halembrió akut toxicitás teszt alapján végeztem, 120 órára kiterjesztett vizsgálati idővel. Az embriókat 24 lyukú szövettenyésztő platekbe helyeztem (1 embrió/lyuk) termékenyülés után egy órával, minden esetben koncentrációnként 12 embriót, 4 ismétlésben. Az embriókat a következő koncentrációkkal kezeltem: EBA: 0,2; 0,5; 1; 5; 10; 12; 15; 17; 18; 19; 21; 23; 25; 27; 29; 30; 35; 40; 50; 60 mg/l; DFA: 500; 450; 400; 350; 300; 250; 220; 200; 180; 100; 50; 1 mg/l. Mivel a DFA esetén a 200 mg/l-es koncentráció esetén sem volt teljes a mortalitás, jelentősen megemelttem a kezelési koncentrációkat.

Kontrollként a ZebTEC haltartó rendszer vizét használtam. A plateket 27 °C-n inkubáltam (Sanyo MIR-154). Naponta vizsgáltam meg minden embriót mikroszkóp alatt, a termékenyülés utáni 120. óráig (120 hpf- *hours post fertilization*). Meghatároztam a mortalitást, morfológiai rendellenességeket kerestem, valamint 72 órával a termékenyülés után digitális felvételeket készítettem az embriókról, 30x-os nagyítás mellett, laterális orientációval. A mortalitást használva végpontként dózis-hatás görbéket vettem fel, melyekből megállapíthattam az LC₁₀ és LC₅₀ értékeket 24 óránként egészen 120 órával a termékenyülés utánig, SPSS 23.0 szoftvercsomag segítségével. A teljes kísérletet minden esetben háromszor ismételttem.

2.2.3 LC-értékek meghatározása a 96-120 órás expozíciós ablakban

A 96 órás korára az embrió átesik a fejlődés legintenzívebb részén, kifejlődnek az emésztőrendszer részei, kinyílik az állat szája, a hormonszintézis és a nukleáris receptorok ebben az időben kezdenek el kialakulni, ezért ebben az életszakaszban már a hormonális hatásokra is érzékenyebbek az embriók. Az embriókat 1 hpf életkorban 24 lyukú szövettenyésztő platekbe helyeztem, majd a 96-120 hpf életszakaszban kezeltem 10, 15, 20, 22, 25, 27, 30, 32, 35, 40 mg/l koncentrációkkal, koncentrációnként 12 embriót, 4 ismétlésben, a plateket 27 °C-on inkubáltam. A vizsgálat végén digitális felvételeket készítettem az embriókról, 30x-os nagyítás mellett, laterális orientációval, a morfológiai elváltozások dokumentálására. A mortalitást használva végpontként dózis-hatás görbét

vettem fel erre az életszakaszra, melyből megállapíthattam az LC₁₀ és LC₅₀ értékeket SPSS 23.0 szoftvercsomag segítségével.

2.2.4 Microarray vizsgálat és transzkriptom analízis

A 96-120 hpf expozíciós ablakban megállapított LC₁₀ értéket alkalmaztam legmagasabb koncentrációként, a szubletális hatások vizsgálatának érdekében. Ezzel együtt összesen 5 koncentráción (1,6; 3,2; 6,4; 12,8; 25,6 mg/l), koncentrációként 6-6 csoportot, csoportonként 50-50 embriót kezeltem. A kezelést 5 cm-es Petri-csészékben végeztem, az embriókat 27 °C-on inkubáltam.

Az embriókat 1,5 ml-es Eppendorf-csővekben homogenizáltam, 200 µl trizolban (TriReagent, Izinta), majd a felhasználásig -80 °C-on tároltam.

Az RNS izolálást 5Prime Phase Lock Gel Heavy kittel végeztem (5Prime GmbH, Germany), a gyártó által biztosított protokoll szerint. Az izolált RNS mintákat ezután Quiagen RNEasy Mini Kittel (Qiagen GmbH, Germany) megtisztítottam, az RNS koncentrációkat NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, USA), a megfelelő mennyiségű RNS-t tartalmazó minták minőségét Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, USA) készülékkel, Agilent RNA 6000 Nano Assay Kit (Agilent Technologies, USA) felhasználásával ellenőriztem.

A microarray vizsgálat során Agilent SurePrint G3 Custom GE 8x60k (Amadid G4102A, Agilent Technologies, USA) arrayt használtam. Minták előkészítését, jelölését, majd a microarray lemezre történő felvitelét a kifejezetten Agilent Gene Expression Oligo Microarray lemezekhez tartozó 'One-Color Microarray- Based Gene Expression Analysis, Low Input Quick Amp Labeling Protocol' alapján végeztem, melyet a gyártó biztosított (Version 6.6, September 2012, Agilent Technologies, USA). A microarray lemezek leolvasása a Genovia GmbH-nál történt (Zwenkau, Germany) Agilent DNA Microarray Scanner segítségével. A microarray lemezen található mezők fluoreszcens jelének intenzitását Agilent Feature Extraction szoftver (verziószám: 10.7.3.1.) használatával nyertem ki. Olyan mRNS transzkripteket kerestem, melyek expressziója legalább egy koncentráció esetén eltér a kontrol csoportban mért expressziótól, majd elvégeztem a főkomponens analízist Agilent GeneSpring 12 GX szoftver segítségével.

Ezek után megvizsgáltam az EBA által befolyásolt gének génexpressziós mintázatait és három génexpressziós klasztert azonosítottam „*K-mean clustering*” (K-alapú csoport analízis) algoritmus segítségével, szintén az Agilent GeneSpring 12 GX szoftver használatával.

Ezek után DAVID (DAVID Bioinformatics Resources 6.8, Leidos Biomedical Research Inc., Frederick, Maryland, USA) biológiai folyamatelemzéssel meghatároztam az egyes klaszterekbe tartozó gének főbb biológiai funkcióit.

A Klaszter2-be tartozó, EBA által koncentrációfüggően gátolt gének vizsgálatánál a GeneMANIA predikciós szervert használtam, melynek segítségével a gének együttes expressziója és fizikai interakciója alapján azonosítottam egy génhálózatot. A génhálózatba tartozó gének szerepének feltérképezésére az Uniprot és ZFIN adatbázisokat alkalmaztam.

2.2.5 1 dpf embriókon végzett comet assay vizsgálat

A vizsgálatot Žegura és Filipić (2004) módszerét alapul véve végeztem, pozitív kontrollként egy szerves peroxidot, Luperox[®]-ot (Sigma) használtam. A vizsgálatához 24 hpf embriók szükségesek. Az embriókat 1 órával termékenyülés után 0,1; 0,5; 1; 2,5; 5; 7,5; 10 és 12 mg/l-es EBA, valamint 20 és 40 mg/l-es Luperox[®] oldattal kezeltem, negatív kontrollként a ZebTEC rendszer vizét használtam. Az alkalmazott legnagyobb koncentráció az akut embrió tesztben meghatározott LC₁₀ értéknek körülbelül a fele volt. Az embriókat 5 cm átmérőjű Petri-csészében kezeltem, 24 órán keresztül inkubáltam, 27 °C-on. Koncentrációnként 6-6 embriót kezeltem, 3 ismétlésben. A vizsgálatához szükséges fully frosted tárgylemezeket (Menzel-Gläser) metanolba helyeztem egy éjszakára. A lemezek leszárítása után felvittem az első réteg agarózt (*Normal melting point agarose*, 1%, Sigma), 80 µl-t mezőnként (2 mező/lemez), melyeket azonnal lefedtem 24x24 mm-es fedőlemezzel (Menzel- Gläser), majd 2 percre jégre helyeztem azokat. Az agaróz megszilárdulása után a fedőlemezeket óvatosan eltávolítottam. Eközben előkészítettem az embriókat, 2 mg/l koncentrációjú pronáz enzim (Sigma) segítségével eltávolítottam az ikrahéjat (4 perc pronáz kezelés, majd 4 rendszervizes öblítés). Mezőnként 1 embriót 60 µl, 1,5 %-os alacsony olvadáspontú, PBS-ben (*Phosphate buffered saline*, Sigma) feloldott agarózba (Low melting point agarose, Sigma) ágyaztam, a fedőlemezt finoman megnyomva oszlattam szét az embriókat a gélben. A lemezeket 2 percre jégre helyeztem, majd a fedőlemezek eltávolítása után a lízis oldatba. Az oldat készítésekor fontos lépés a pH beállítása 10-re, valamint használat előtt 2,5 ml Triton X-100-at (Sigma) kell hozzáadni és óvatosan rázogatva homogenizálni.

A lemezeket 1 órára 4 °C- ra helyeztem. A DNS fényérzékenysége miatt innentől derengő fényben dolgoztam tovább. A lízis után a lemezeket lecsepegtettem, majd áthelyeztem az elektroforézis kádba, melyet előzőleg

már feltöltöttem az elektroforézis oldattal (3000 ml oldathoz: 1,11 g EDTA, 90 ml 10N NaOH), 20 percen keresztül inkubáltam 4 °C-on, majd bekapcsoltam az elektroforézis készüléket (BioRad PowerPac Basic, BioRad, U.S.A.). 25 V feszültség és 400 mA áramerősség mellett 20 percen keresztül üzemeltettem. A lemezeket ezután kiemeltem, lecsöpögtettem, majd a neutralizáló oldatba (250 ml oldathoz 12,114g TRIS, pH=7,5) helyeztem és 15 percig inkubáltam 4 °C-on. A lemezeket ezután vízzel átítatott papírral kibélelt edénybe helyeztem, légmentesen lezártam, fotózásig 4 °C-on tároltam. A comet assay protokoll végén a lemezeket 2µg/l-es etídium-bromid oldattal megfestettem, lefotóztam Nikon Eclipse E600 mikroszkóppal, 510-560 nm hullámhosszú fluoreszcens fényvel, QImaging MicroPublisher 3.3 RTV kamerával és a hozzá tartozó QImaging szoftverrel, majd TriTek CometScore™ Freeware 1.5 szoftver segítségével meghatároztam a DNS%-ot a csóvában. Koncentrációnként 3-3 ismétlésben, ismétlésenként 45 mérést végeztem. A koncentrációk összevetéséhez Kruskal-Wallis tesztet ($H = 978,714$; $df = 10$, $p < 0,00001$), míg a páronkénti összevetéshez Dunn- tesztet alkalmaztam (SPSS 23.0 szoftvercsomag). A kísérletet háromszor ismételt meg.

2.2.6 Kifejlett halakon végzett mikronukleusz teszt

A mikronukleusz teszthez a módszer sajátosságai miatt kifejlett, 6-8 hónapos egyedeket használtam, melyek a többi vizsgálathoz hasonlóan ebben az esetben is AB zebradánió vonalból származtak. A kísérleti állatokat a 2.1. fejezetben ismertetett tartási körülmények között tartottam. A teszt félstatikus rendszerben történt, a kezelő oldatot kétnaponta cseréltem.

Legmagasabb kezelési koncentrációként a korábbi irodalmi adatok alapján 96 órás kitettség esetén számolt LC_{10} értéket alkalmaztam (11 mg/l), ezzel elkerülhető a halak idő előtti pusztulása, ám előidézhető szubletális hatások. A két további $LC_{10}/2$ (5,5 mg/l) és $LC_{10}/4$ (2,75 mg/l) volt. Minden koncentrációból 3 csoportot alakítottam ki, csoportonként 8-8 vegyes ivarú hallal. A kezelés 21 napig tartott, 7 naponta történt mintavételezés, koncentrációnként 4-4 hal került mintázásra.

Minden mintavétel esetén az állatok életének kíméletes kioltása érdekében azokat MS-222 alkalmazásával túllaltattam, majd dekapitáltam, ezután vérüket azonnal, vékony rétegben mikroszkóp tárgylemezre (Menzel-Gläser) vittem fel. A vérminták megszáradása után következett a festésük, Hoechst 33342 (5µM) festékkel. A minták vizsgálata epifluoreszcens mikroszkóppal (Olympus BX-51) történt. 400X-os

nagyítás mellett, a kéken fluoreszkáló mikronukleuszok kerültek megszámlálásra 2000 véletlenszerűen kiválasztott, ép citoplazmájú eritrocitában minden tárgylemez esetén. Azok a sejtek számítottak mikronukleáltaknak, melyek: 1. mikronukleusza kisebb, mint a sejtmag $1/3$ -a; 2. ugyanabban a síkban vannak; 3. a mikronukleuszok és a sejtmag ugyanolyan színnel és intenzitással fluoreszkálnak, 4. kerek vagy ovális alakúak; 5. tisztán elkülönül a mikronukleusz és a sejtmag.

Az leíró statisztikát STATISTICA 12 szoftvercsomag (StatSoft, Tulsa, OK, USA) segítségével készítettem. Az egyes csoportok összehasonlítására Poisson-regressziót alkalmaztam ($p < 0,05$).

2.2.7 Regenerációs kapacitás vizsgálata lárvákon

A 96 hpf zebradánió lárvákat a sebzést megelőzően MS-222 oldatba helyezve elaltattam. Ezt követően az altatásban lévő lárvák farokúszó-végét steril körülmények között, fénymikroszkóp alatt borotvapengével eltávolítottam. Ennek során ügyeltem arra, hogy a sebzés iránya merőleges legyen az állat hossz tengelyére nézve, és minél egyenletesebb vágási felületet eredményezzen. A sebzést követően az állatokról altatásban, oldalnézetben fényképet készítettem fénymikroszkóp alatt. Ezt követően a lárvákat rendszervízzel óvatosan átöblítettem, majd individuálisan a kezelési oldatokat tartalmazó 24-lyukú szövettenyésztő plateekbe helyeztem azokat. A 24 órás expozíció elteltével az állatokat rendszervíz segítségével óvatosan átöblítettem, a fent leírt altatási protokoll alkalmazása után fénymikroszkóp alatt oldalnézetben fényképeztem, majd minden kezelési csoporthoz tartozó egyedeket kontroll körülmények közé helyeztem. A sebzést követő 48., illetve 72. órában ismét fényképet készítettem a lárvákról. Az elkészült képeket ImageJ szoftver (NIH&LOCI, Wisconsin, USA) segítségével elemeztem. A regeneráció mértékét a lárvák gerinchúrja által kijelölt hossz tengely és az arra merőleges irányú sebzés metszéspontjától mért egyenes vonalú szakasz hosszának növekedése alapján határoztam meg. (A ténylegesen lemért szakasz kezdőpontját a gerinchúr jól behatárolható vége szolgáltatta, a végpontját pedig a regenerálódó farokúszó aktuális vége.) Az aktuálisan regenerálódott szakasz (Δl) hosszát úgy határoztam meg hogy az aktuális teljes lemért távolságból (d_n , $n=24, 48, 72$ hpA) kivontuk a sebzést követő kiindulási távolságot (d_0).

3 Eredmények

3.1 Előkísérletek

A munkám során vizsgált vegyületek embriókra gyakorolt hatásairól nem állt rendelkezésre toxicitás adat, így első lépésként meg kellett határozni, hogy mely koncentráció tartományban toxikusak.

Az első előkísérletben mindkét vegyület esetén 200; 100; 50; 25; 12,5 és 6,25 mg/l koncentrációkat alkalmaztam egy-egy határérték-kereső teszt keretein belül. A DFA esetében bebizonyosodott, hogy toxicitása zebradánió embriókra nézve alacsony, hiszen 120 óra elteltével a 100 mg/l-es koncentrációban a kezelt csoportokban alig volt tapasztalható elhullás. A koncentrációk további emelésével megállapítottam, hogy a várható LC₅₀ értékek 150 és 250 mg/l között lesznek.

Az EBA-n végzett előkísérletek során a legmagasabb koncentrációkban már pár óra elteltével elpusztultak az embriók. A várható LC₅₀ értékeket 15 és 35 mg/l közé becsültem.

3.2 120 órás embrió vizsgálatok

A DFA esetében az előkísérletek alapján magas LC-értékeket, tehát alacsony toxicitást vártam, amit a 120 órás embrió vizsgálatokkal sikerült igazolni. 24 órával a termékenyülés után 207,2 mg/l, 48 órával a termékenyülés után 196,5 mg/l, 72 órával termékenyülés után 187,5 mg/l, termékenyülés után 96 órával 180,2 mg/l, míg a vizsgálat végén, tehát a termékenyülés után 120 órával 171,6 mg/l volt a vegyület LC₅₀ értéke, tehát az expozíciós idő növekedésével a vegyület toxicitása is növekedett.

Az embriók mikroszkópos vizsgálata során megfigyelhető volt a zebradánió embriókra jellemző, a mérgező anyagok hatására gyakran kialakuló sziködéma és perikardiális ödéma, valamint a szik szürkés-opálössá válása. A magasabb koncentrációk esetén megfigyelhető volt az embriók farkának dorzális irányba történő elgörbülése, a 220 mg/l-es koncentráció feletti kezeléseknél az embrióknál teljes testtorzulás volt megfigyelhető. Ezek az elváltozások a kontroll csoportban nem jelentkeztek.

Az előkísérletek alapján az EBA esetén a DFA-hoz képest jóval alacsonyabb LC-értékeket vártam. A 120 órás embrióvizsgálatok során ezt sikerült is bizonyítani. 24 órával a termékenyülés után 31,45 mg/l, 72 órával a termékenyülés után 27,52 mg/l, 96 órával a termékenyülés után 22,01 mg/l, míg a vizsgálat végén, tehát a termékenyülés után 120 órával 18,44 mg/l volt a vegyület LC₅₀ értéke, tehát az expozíciós idő növekedésével nőtt az anyag toxicitása.

Ezen vegyület esetén is elvégeztem a mikroszkópos morfológiai vizsgálatot. A zebradánióra jellemző elváltozások, mint sziködéma és perikardiális ödéma, valamint a szik opálosodása, a DFA-hoz hasonlóan ebben az esetben is jelentkeztek. Ezekon kívül torz fejlődést tapasztaltam a farki részen, a faroknyél környékén, továbbá az úszószegély pereme is szabálytalan volt. Magasabb koncentrációk esetében az embriók nem voltak képesek elhagyni az ikrahéjat, mert súlyos fejlődési rendellenességeik miatt tulajdonképpen mozgásképtelenek voltak.

Mivel a DFA nem bizonyult toxikusnak zebradánió embriókra nézve, így további kísérleteimet az EBA-val végeztem el.

3.3 LC-értékek meghatározása a 96-120 hpf expozíciós ablakban

Minden kezelt csoportban megfigyelhető volt a perikardiális ödéma, a sziködéma, a testszegmensek összemosódása, valamint a szik szürkés-opálos elszíneződése, az úszóhólyag hiánya, továbbá a legmagasabb, 30 mg/l-es koncentráció esetén a fej torzulása is. Mivel a microarray vizsgálat szubletális hatások tanulmányozására irányul, ezért ebben az előkísérletben az LC₁₀ érték meghatározása volt az elsődleges, mely 25,59 mg/l volt, míg az LC₅₀ 30, 94 mg/l.

3.4 Microarray vizsgálat és transzkriptom analízis

Azokat az mRNS transzkripteket azonosítottam, melyek legalább egy koncentrációban másképp szabályozódtak ($p < 0,05$, $FC \geq 2$), így 721 mRNS mutatott szignifikáns, EBA- dependens regulációt. A PCA (*principal component analysis* - főkomponens analízis) alapján a kontrol és a kezelt csoportok egyértelműen elkülönültek. Az EBA-kezelés a legmagasabb koncentrációban teljesen eltérő mRNS-expressziós profilt eredményezett, mint a kontroll vagy az alacsonyabb koncentrációkkal kezelt csoportok.

Ezután tovább vizsgáltam a 721 EBA által szabályozott génextpressziós mintázatát, és három különböző génextpressziós klasztert azonosítottam „*K-mean clustering*” módszer (K-alapú csoport analízis) segítségével. Két EBA-indukált génextpressziós klasztert azonosítottam, mely koncentrációfüggő expozíciót mutatott. A Klaszter1 198 EBA-ra reagáló gént tartalmaz, amelyeket expressziója koncentrációfüggő emelkedést mutatott a zebradánió embriókban. Ezzel szemben a Klaszter3 320 tagja csak a legmagasabb (25,6 mg/l) EBA-koncentrációnál mutatott megnövekedett mRNS-expressziót. Végül 203 gént találtam, amelyeknél az EBA expozíciót követően csökkentett mRNS expresszió mutatkozik (Klaszter2).

Az EBA által szabályozott gének funkcionális tulajdonságainak jellemzése céljából azonosítottam azokat a biológiai funkciókat, amelyek szignifikánsan felülreprezentáltak a különböző, EBA-ra reagáló gén expressziós klaszterekben. A DAVID (DAVID Bioinformatics Resources 6.8, Leidos Biomedical Research Inc., Frederick, Maryland, USA) biológiai folyamatelemzésével számos stressz- és DNS-károsodással összefüggő biológiai funkciókat azonosítottam, ideértve a sejtek stresszreakcióját, a sugárzásra adott reakciót, a DNS helyreállítását és a DNS-károsító stimulusra adott választ, amelyek túltreprezentációja az 1. génextpressziós klaszterre jellemző.

A biológiai folyamatelemzés továbbá azt is kimutatta, hogy a nagy dózisu (25,6 mg/l) EBA-expozíció indukálhatja az immunrendszerrel és a gyulladással kapcsolatos gének expresszióját. Az is megállapítható, hogy a sejtproliferációhoz kapcsolódó biológiai funkciók kategóriák, mint például a sejtosztódás, a sejtciklus, az M fázissal (a sejtosztódás azon fázisa, melynek során lejátszódik a kromoszómák szegregációja, a sejtmag és a sejt kettéosztódása) kapcsolatos folyamatok, a sejtciklus fázis és a sejtciklus folyamat szignifikánsan felülreprezentáltak az EBA által elnyomott gének között. Ezen EBA-gátolt gének további vizsgálatánál GeneMANIA predikciós szerver segítségével azonosítottam a 18-tagú sejtosztódáshoz kapcsolódó génhálózatot az együttes expresszió és a fizikai interakció alapján.

Összefoglalva, a globális génextpressziós elemzés felvetette annak a lehetőségét, hogy az EBA-nak való kitettség indukálhatja a DNS károsodás és a gyulladáshoz kapcsolódó gének expresszióját, és gátolhatja a sejtproliferációhoz kapcsolódó géneket. Ezen feltevések igazolásának érdekében végeztem további kísérleteimet.

3.5 1 dpf embriókon végzett comet assay vizsgálat

A kísérletben pozitív kontrollként használt szerves peroxid, a Luperox® minden esetben egyértelműen károsította a DNS- spirált a haltartó rendszer kontrollként használt vizéhez képest. A kezelt csoportok esetén már a legalacsonyabb, 0,5 mg/l-es koncentrációban szignifikánsan megnőtt a csóvában található DNS mennyisége a kontrollhoz képest ($P < 0,05$). Vizsgálatom alapján a DNS töredezettség mértékének emelkedése dóziszfüggőnek bizonyult.

3.6 Kifejlett halakon végzett mikronukleusz assay

A Poisson-regresszió kimutatta a mikronukleuszok kialakulási gyakoriságának szignifikáns növekedését a kontroll csoporthoz viszonyítva.

Már az első héten megfigyelhető volt a mikronukleuszok számának növekedése, még a legalacsonyabb alkalmazott koncentráció esetén is. Azonban ez a különbség csak a harmadik hétre vált szignifikánssá ($P < 0.05$). A kísérlet végére a 2,75 mg/l-es koncentráció esetében $2,75 \pm 2,22$, az 5,5 mg/l és a 11 mg/l-es koncentrációk esetén pedig $3,5 \pm 1,29$, valamint $3,5 \pm 1,00$ mikronukleusz alakult ki. Az egyes csoportok között nem volt statisztikailag kimutatható különbség, így megállapítható, hogy a kísérletben alkalmazott koncentrációk esetén a hatás nem volt koncentrációfüggő. Eredményeim alapján a módszer alkalmas alacsony koncentrációk esetén az EBA felnőtt halakra gyakorolt DNS-károsító hatásának kimutatására.

3.7 Regenerációs kapacitás vizsgálata

A vizsgálat eredményeinek elemzése során 24 óra elteltével nem találtam statisztikailag igazolható különbséget a kezelt csoportok és a kontroll között. 48 óra elteltével minden kezelt csoportban szignifikánsan kisebb volt a regeneráció mértéke, mint a kontrol csoportban, továbbá a 6,4 mg/l-es csoport az 1,6 mg/l-es csoporthoz képest is szignifikánsan rövidebb volt a regenerálódott farokrész. A kezelés után 72 órával megismételt mérések is ugyanezt az eredményt hozták. Eredményeim alapján az EBA egyértelműen csökkenti a farokúszó regenerációs képességét, tehát valóban hatással van a sejtosztódással és sejtciklussal kapcsolatos folyamatokra.

4 Új tudományos eredmények

1. Az EBA esetén elsőként határoztam meg a pusztulás dózis-hatás összefüggéseit akut toxicitás tesztek segítségével. A 4-etilbenzaldehyd félhalálos koncentrációi zebradánió embriókra 95%-os konfidencia intervallum mellett: 24 hpf: $31,45 \pm 0,82$ mg/l; 48hpf: $30,85 \pm 0,89$ mg/l; 72hpf: $27,52 \pm 1,5$ mg/l; 96hpf: $22,00 \pm 1,39$ mg/l; 120hpf: $18,44 \pm 1,91$ mg/l; valamint 96-120 hpf expozíciós ablakban: $30,94 \pm 1,85$ mg/l.

2. A DFA esetén elsőként határoztam meg a pusztulás dózis-hatás összefüggéseit akut toxicitás tesztek segítségével. A 2-4-difluoroanilin félhalálos koncentrációi zebradánió embriókra 95%-os konfidencia intervallum mellett: 24 hpf: $207,2 \pm 9,65$ mg/l; 48 hpf: $196,5 \pm 11,2$ mg/l; 72 hpf: $187,5 \pm 10,9$ mg/l; 96 hpf: $180,2 \pm 9$ mg/l; 120 hpf: $171,6 \pm 9,55$ mg/l.

3. Elsőként vizsgáltam a 4-etilbenzaldehyd génexpresszióra gyakorolt hatását halakon. Megállapítottam, hogy az EBA a DNS károsodással és javító mechanizmusokkal kapcsolatos biológiai funkcióval rendelkező gének expresszióját növeli, a sejtciklussal és sejtosztódással kapcsolatos génekét csökkenti, mindkét esetben dóziszfüggően. Az immunválasszal kapcsolatos gének expresszióját kizárólag a legmagasabb koncentrációban ($25,6$ mg/l) növeli a kontrollhoz viszonyítva.

4. Kimutattam az EBA DNS-károsító hatását zebradánió embriókon akut kísérletben, comet assay módszerrel, valamint kifejlett egyedeken szubkrónikus kísérletben, mikronukleusz tesztet alkalmazva.

5. Először vizsgáltam az EBA regenerációs képességre gyakorolt hatását. A farokregenerációs kísérlet eredményei alapján az EBA még alacsony koncentrációban is egyértelműen csökkenti a szövetregeneráció sebességét, tehát hatással van a sejtosztódásra.

6. Az együttes expozíció és fizikai interakció alapján leírtam egy 18 génből álló, sejtproliferációval kapcsolatos génhálózatot, melynek tagjai az EBA hatására csökkent expressziót mutatnak.

5 Következtetések és javaslatok

5.1 Akut halembrió toxicitás tesztek eredményeiből levonható következtetések

Halembriókon végzett vizsgálataim során a DFA toxicitása alacsonynak bizonyult, 96 órás expozíció mellett az LC₅₀ érték 186 mg/l-nek adódott. Mivel mind az adult egyedekre vonatkozó (OECD TG 203), mind pedig az embriókra vonatkozó (OECD TG 236) akut toxicitás irányelvben szerepel az LC₅₀=100 mg/l határérték, ha a limit tesztben kapott toxicitási határérték ennél magasabb, az anyag nem számít halakra nézve toxikusnak. Az anyag biztonsági adatlapján (CAS 367-25-9) kizárólag patkányra vonatkozó toxicitás értékek szerepelnek, orális alkalmazás esetén az LD₅₀ értéke 820 mg/ttkg, dermálisan 672 mg/ttkg, míg 4 órás inhalációval 6,21 mg/m³, tehát emlősökre nézve sem magas a toxicitása. Mivel a DFA-hoz tartozó, zebradánió embrión vizsgált LC₅₀ érték nem lelhető fel a tudományos irodalomban, ezért fontosnak tartottam annak meghatározását.

Munkám során nem csupán az LC értékeket határoztam meg, hanem fenotípusos vizsgálatot is végeztem az embriókon. A DFA esetében megfigyeltem néhány általános, toxikus anyagok hatására kialakuló elváltozást az embriókon, mint a perikardiális ödéma és a szikanyag szürkés elszíneződése, a 100 mg/l fölötti koncentrációk esetében a halak gerince háti irányban meggörbült, ám ennek mértéke nem bizonyult koncentrációfüggőnek. Ez a görbület hasonlóságot mutat a *heart and soul* (has) mutáns egyedek fenotípusával, mely az atipikus protein-kináz C (*aPKC*) gén mutációjára vezethető vissza.

Vizsgálataim során meghatároztam az EBA zebradánió embriókra vonatkozó akut toxicitását is, illetve az EBA esetében is végeztem fenotípusos vizsgálatot, melynek során a DFA-hoz hasonlóan a zebradánióra jellemző általános tünetek, úgy, mint perikardiális ödéma, a szik szürkés elszíneződése jelentkeztek. Ezekon a tüneteken kívül megfigyelhető volt a farok torzulása, illetve az úszószegélyek szélének szabálytalansága, ám egyik elváltozás sem bizonyult koncentráció függőnek.

Az úszószegélyek torzulása az ibuprofén esetén nem jellemző, ám a mellúszó torzulása, magasabb koncentrációk (10-100 µg/l) esetén hiánya, igen. Mind a perikardiális ödéma, mind pedig az úszók fejlődési rendellenességei az ibuprofén ciklooxigenáz enzimekre gyakorolt gátló hatására vezethető vissza. Mint nem szelektív ciklooxigenáz inhibitor, ciklooxigenáz enzimek (COX-1, COX-2) gátlásán keresztül gátolja a prosztanoidok termelődését. A zebradánió fejlődése szempontjából a

prosztainoidok közül a prosztaglandinok szükségesek a testszervények kialakulásához. Hiányában a szervények közötti erek megrövidülnek, szív és úszó fejlődési rendellenességek alakulnak ki, az általam tapasztalt rendellenességek háttérben tehát ez a folyamat is állhat.

Az EBA szerkezetében és fiziko-kémia tulajdonságaiban is nagyon hasonló, az élelmiszeriparban mesterséges mandula olajként ismert benzaldehydhez. Az embriókon megfigyelt tünetek visszavezethetők a benzaldehyd sejten belüli metabolizációjára. A bejutást követően aktiválja a citokróm P450 rendszert, mely benzoésavvá és benzil-alkohollá alakítja, mely szekréción során távozik a sejtől. A transzformáción át nem esett benzaldehyd molekulák, illetve az azokból képződött benzoésav közvetlenül képes károsítani a DNS-t, továbbá a benzaldehyd csökkenti a glutation-peroxidáz enzimek (GPx) aktivitását, azáltal nő az oxidatív stressz és a lipidperoxidáció mértéke.

5.2 A transzkriptom analízis és annak eredményét igazoló vizsgálatokból levonható következtetések

DAVID biológiai funkcióelemzés segítségével a Klaszter 1-ben számos stresszel és DNS-károsodással összefüggő biológiai funkciókat azonosítottam, ideértve a sejtek stresszreakcióját, a sugárzásra adott reakciót, a DNS helyreállítását és a DNS-károsító stimulusra adott választ. Az EBA-nak való kitettség koncentráció függő módon indukálja a DNS károsodással és javító mechanizmusokkal, valamint a sejtszintű stresszválasszal kapcsolatos gének expresszióját. Ebből arra következtettem, hogy az EBA potenciális DNS-károsító hatással rendelkezik, hiszen nő a javító folyamatok aktivitása. Mivel a microarray vizsgálatot embriókon végeztem, esetükben a feltételezésem igazolására comet assay-t használtam. Az EBA kezelés hatására koncentráció függő mértékben nőtt a DNS-töredezettesség mértéke, tehát ezzel az egyszerű módszerrel sikerült igazolni, hogy az EBA, zebradánio embriók esetén valóban káros hatással van az örökítőanyagra, a javító mechanizmusokkal kapcsolatos gének expressziója nő, ám ez sem elég az anyag káros hatásainak kompenzálására.

Kifejlett egyedek esetében is megvizsgáltam az anyag feltételezett DNS-károsító hatását, mikronukleusz assay segítségével. A kísérlet 21. napjára statisztikailag igazolható módon nőtt a mikronukleuszok száma a kezelt csoportokban. Ebből arra következtetek, hogy kifejlett egyedek esetén is DNS-károsító hatása van az EBA-nak, ám az alacsonyabb kezelési koncentráció miatt több hetes expozíció szükséges annak kialakulásához. Az EBA anyamolekulája, az ibuprofén is rendelkezik DNS-károsító hatással.

Az EBA-hoz fiziko-kémiai tulajdonságaiban leginkább hasonló benzaldehid örökítőanyagot károsító hatását is igazolták már humán limfocitákon comet assay, míg ecetmuslicákon (*Drosophila melanogaster*) SMART teszt alkalmazásával. A benzaldehid DNS-károsító hatásának hátterében sejten belüli metabolizációja áll, melyet az 5.1. fejezetben már leírtam.

A biológiai folyamat elemzés azt is kimutatta, hogy a nagy dózisu (25,6 mg/l) EBA-expozíció indukálhatja az immunrendszer működésével, a szerves és szervetlen anyagokra adott sejtszintű válaszokkal, illetve az aminosav származékok sejten belüli metabolizmusával kapcsolatos gének expresszióját. A már ismert irodalmi adatok mellett mind az EBA által kiváltott DNS-károsodás és az ehhez kapcsolódó gének expressziójának növekedése, mind pedig a Klaszter 3 biológiai funkciói és expresszió növekedése arra enged következtetni, hogy az EBA sejten belüli metabolizációja és hatása a sejtek működésére nagy hasonlóságot mutat a benzaldehyddel és ez az összetett mechanizmus áll a tapasztalt elváltozások hátterében.

Az ibuprofén, amellet, hogy nem szelektív cikooxygenáz inhibitor, zebradánió halfajon vizsgálva, serkentő hatással van az antioxidáns enzimek közül a glutation peroxidázra (GPx) és a glutation-S-transzferázra (GST). Ez magyarázható azzal, hogy a sejtekben az ibuprofen hatására oxidatív stressz alakul ki, így az erre adott válaszként nő ezen enzimek aktivitása. A glutation reduktáz (GR) és kataláz (CAT) enzimekre azonban nincs hatással, valamint a kezelt csoportokban a lipidperoxidációs folyamatokat jelző malondialdehyd szintje is alacsonyabbnak bizonyult, mint a kontroll csoportokban. Az ibuprofén zebradánión, a benzaldehyddel ellentétben, tehát nem indukál oxidatív stresszt, sőt szerepe van a lipidperoxidáció megelőzésében. Az általam vizsgált EBA hatásmechanizmusát tekintve tehát közelebb áll a hozzá kémiai szerkezetében, fiziko-kémiai tulajdonságaiban leginkább hasonlító benzaldehydhez, mint az anyamolekulához, az ibuprofénhez.

Az is megállapítható, hogy a sejtproliferációhoz kapcsolódó biológiai funkciók kategóriák, mint például a sejtosztódás, a sejtciklus, a sejtosztódás M fázisa, a sejtciklus fázis és a sejtciklus folyamat szignifikánsan felülreprezentáltak az EBA által elnyomott gének között (Klaszter 2). A klaszterbe tartozó, EBA-gátolt gének további vizsgálatánál a GeneMANIA predikációs szerver segítségével azonosítottam egy 18-tagú sejtosztódáshoz kapcsolódó génhálózatot, az együttes expresszió és a fizikai interakció alapján. Az UniProt és ZFIN adatbázisokban megtalálható információk alapján elmondható, hogy mind a 18 gén kulcs szerepet játszik a sejtosztódásban, többségük az osztódáshoz szükséges elemek kialakításában

(*ercc6l, mis12, esco2, nusap1, ndc80, nuf2, sgoll, plk1, kif23*), míg bizonyos gének főként az osztódási folyamatok szabályozásában (*ttk, cks1b, mad21l, cdca8, ccnb1, ccnb2, cdc20, cdca7a, fbox5*) vesz részt. A *sgoll* gén mutációja emberekben a CAID-szindróma (*chronic atrial and intestinal dysrhythmia* – krónikus pitvari és intesztinális diszritmia) kiváltó oka. Korábbi vizsgálatok során zebradániókban morpholino oligonukleotid segítségével kiütötték a *sgoll* gént és a kísérleti állatok az embereken is tapasztalható tüneteket mutatták. Tehát ha külső hatások által csökken ennek a génnek az expressziója, az káros lehet a szív megfelelő működésére, ám ennek igazolására további vizsgálatok szükségesek. Az általam leírt génhálózat két tagja, az *esco2* és a *ttk* részt vesznek a farokúszó regenerációjában, továbbá a *mad21l, fbox5, kif23* gének is expresszálnak a proliferatív területeken, így ezek expresszió csökkenéséből arra következtettem, hogy az EBA negatív hatással van a regenerációs folyamatokra. Feltételezésem igazolására farokregenerációs vizsgálatot végeztem 96 hpf korú embriókon, melynek során megállapítottam, hogy következtetésem helyes volt, hiszen a kezelt csoportokban szignifikánsan csökkent a regeneráció mértéke.

Ezeket a tényeket figyelembe véve, eredményeim alapján elmondható, hogy nagyobb figyelmet kell fordítani mind a víztisztítási melléktermék vegyületek, mind pedig az élelmiszerekbe bekerülő anyagok részletes toxikológiai vizsgálatára, mert komoly veszélyeket jelenthetnek mind a fogyasztókra, mind pedig a környezetre.

5.3 Javaslatok

- Az EBA példájából jól látszik, hogy a kevés rendelkezésre álló adat ellenére forgalomba kerülhetnek bizonyos vegyületek, melyek ártalmasak lehetnek az emberi egészségre és a környezetre, ezért javaslom további vizsgálatát más tesztszervezeteken, valamint további víztisztítási melléktermékvegyületek és élelmiszeripari adalékanyagok komplex toxikológiai vizsgálatát akut, szubkrónikus és krónikus vizsgálatokban.
- Mivel a 72 hpf embriók farka háti irányban elgörbült minden 100 mg/l feletti kezelési koncentráció esetén, így felmerült annak a lehetősége, hogy a DFA ösztrogénszerű hatással rendelkezik, hiszen ezt a rendellenességet már más szerzők is leírták bizonyítottan ösztrogénhatású anyagok esetén. A fark görbülete hasonlóságot mutat a *heart and soul* (has) mutáns egyedek fenotípusával, mely az

atipikus protein-kináz C (*aPKC*) gén mutációjára vezethető vissza. Az *aPKC* gén mutációjának vizsgálatára specifikus morpholino oligonukleotid alkalmazását javaslom. Az anyag esetleges ösztrogénszerű hatásainak vizsgálatára pedig alkalmas lehet a *Tg(vtg1:mCherry)* ösztrogén érzékeny, májtranszgenikus zebradánió vonal.

- A microarray vizsgálatom alapján, melyből kiderült, hogy az EBA potenciális DNS-károsító hatással rendelkezik, hiszen számos, DNS-javító mechanizmusokkal kapcsolatos gén expresszióját növeli. Továbbá számos sejtsztódással kapcsolatos gén expresszióját csökkenti, mely arra enged következtetni, hogy negatívan befolyásolja sejtsztódást, ezáltal a regenerációs képességet. Ezeket a feltevéseket klasszikus módszerekkel (comet assay, mikronukleusz assay és farokregenerációs vizsgálat) sikerült alátámasztani, ám a folyamatok behatóbb tanulmányozására a FISH-comet assay-t javaslom, mely a comet assay és a fluoreszcens *in situ* hibridizáció kombinációja, így pontosabb képet kaphatunk az anyag hatásáról és az egyes gének kifejeződéséről.
- A szakirodalmi adatok alapján az EBA sejtsztintű hatásmechanizmusa feltételezhetően hasonlít a benzaldehydére, így hatással lehet a GPx és GST antioxidáns enzimekre. Javaslom az EBA oxidatív stresszre gyakorolt hatásának vizsgálatát.

Az értekezés témakörében megjelent közlemények

Tudományos közlemények folyóiratban:

Bencsik D., Gazsi Gy., Urbányi B., Szende B., Rácz G., Véha A., Csenki Zs. (2018): Preliminary study: Assessment of subacute genotoxic and histopathological effects of a food flavour, 4-ethylbenzaldehyde (EBA) on zebrafish (*Danio rerio*) model, ACTA ALIMENTARIA: AN INTERNATIONAL JOURNAL OF FOOD SCIENCE 47: 2 pp. 245-251. (IF: 0,384)

Bencsik D. (2013): Actual problems, possibilities and trends in drinking water testing, Animal Welfare, Etológia és tartástechnológia (AWETH), 9(3): 86-91.

Konferencia kiadványban összefoglalóként megjelent közlemények:

Bencsik D.; Szabó P. B.; Gazsi Gy.; Urbányi B.; Szende B.; Rácz G.; Véha A.; Csenki Zs. (2018): Subacute effects of a food flavour on fish model, Book of Abstracts - International Conference on Science, Technology, Engineering and Economy (ICOSTEE 2018), Szeged, Magyarország: Szegedi Tudományegyetem Mérnöki Kar, (2018) p. 38

Szabó, R T.; Kovács, B.; **Bencsik, D.**; Kovács, R.; Horváth, Á.; Mézes, M.; Balogh, K.; Weber, M (2016): A CometScore programmal, illetve vizuálisan történő kiértékelés összehasonlítása comet-assay esetében, XXXVI. Óvári Tudományos Nap - Hagyomány és innováció az agrár- és élelmiszergazdaságban: Tudományos Nap Összefoglalók, Mosonmagyaróvár, Magyarország: Széchenyi István Egyetem Mezőgazdaság- és Élelmiszertudományi Kar, p. 61.

Bencsik, D., Bakos., K., Fetter, E., Scholz,S., Kovács, R., Gazsi, Gy., Kövesi, J., Csepeli, A., Szende, B., Rácz, G., Urbanyi, B., Csenki, Zs. (2014): Test the water! Effects of a water disinfection byproduct on zebrafish embryos, In: 11th International Congress on The Biology of Fish. Edinburgh, Egyesült Királyság (2014. augusztus 3-7.), Abstract Book pp. 53

Bencsik D., Bakos K., Fetter É., S. Scholz, Kovács R., Gazsi Gy., Kövesi J., Csepeli A., Appl Á., Szende B., Rác G., Urbányi B.*, Csenki Zs. (2014): Egy víztisztítási melléktermék, a 4-etilbenzaldehyd zebra-dánió (*Danio rerio*) embrióra gyakorolt hatásának vizsgálata, XXXVIII. Halászati Tudományos Tanácskozás, Szarvas, Konferencia Kiadvány p. 33.

Bencsik D., Kanizsai B., Csepeli A., Bakos K., Kovács R., Gazsi Gy., Rác G., Szende B., Urbányi B., Csenki Zs. (2013): Öntsünk tiszta vizet a pohárba!- hagyományos víztisztítási technológiák során visszamaradó melléktermék vegyületek vizsgálata halembrió- modellen, I. Halászati Felsőoktatási Workshop, Akasztó, Konferencia kiadvány p.93-99.

Az értekezés témaköréhez nem kapcsolódó, fontosabb közlemények

Tudományos közlemények folyóiratban:

Bakos K., Kovacs R., Balogh E., Sipos D. K., Reining M., Gyomrei-Neuberger O., Balazs A., Kriszt B., **Bencsik D.**, Csepeli A., Gazsi G. (2019): Estrogen sensitive liver transgenic zebrafish (*Danio rerio*) line (Tg (vtg1: mCherry)) suitable for the direct detection of estrogenicity in environmental samples. *Aquatic toxicology*;208:157-67. (IF:3,794)

Kovács R., Bakos K., Urbányi B., Kövesi J., Gazsi Gy, Csepeli A., János A. Appl A., **Bencsik D.**, Csenki Zs., Horváth Á. (2015): Acute and sub-chronic toxicity of four cytostatic drugs in zebrafish. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(15): 14718–14729. (IF 2,828)

Staszny Á., Havas E., **Kovács R.**, Urbányi B., Paulovits G., **Bencsik D.**, Ferincz Á., Müller T., Specziár A., Bakos K., Csenki Zs. (2013): Impact of environmental and genetic factors on the scale shape of zebrafish *Danio rerio* (Hamilton 1822): a geometric morphometric study. *Acta Biologica Hungarica*, 64(4): 462–475. (IF:0,504)

Kovács R., Urbányi B., Kovács B., **Bencsik D.**, Staszny Á., Hegyi Á., Csenki Zs. (2009): A zebra-dánió (*Danio rerio*) mint a toxikológiai vizsgálatok modellállata *Animal Welfare, Etológia és tartástechnológia (AWETH)*, 5(4): 446-447.

Konferencia kiadványban összefoglalóként megjelent közlemények:

Szabo E., Kovács R., Plangár I., Tokés T., Polanek R., Czifrus S.Z., **Bencsik D.**, Hideghéty K. (2015): PO-1074 Vertebrate model to examine the biological effectiveness of different radiation qualities, Radiotherapy&Oncology, Volume 115, Supplement 1, S580, 3rd ESTRO Forum 24-28 April 2015, Barcelona, Spanyolország

Urbanyi, B., Bakos, K., Kovacs, R., Reining, M., Gazsi, G., Kovacs, B., Csepeli, A., Kövesi, J., **Bencsik, D.**, Simon, G., Csenki, Z. (2014) Zebrafish: A toxicological “multitool”. In: Aquaculture Europe 2014, 2014. október 14-17. San Sebastián, Spanyolország pp. 1372–1373

Kovács R., Csenki Zs., Tarcai Zs., Gazsi Gy., **Bencsik D.**, Bakos K., Kovács B., Urbányi B., Filipič M., Horváth Á. (2012): Effects of 5-fluorouracil and cisplatin to the embryonic and early life stage development of zebrafish (*Danio rerio*). Fish and amphibian embryos as alternative models in toxicology and teratology, 2012. október 23-24., Aulnay-sous-Bois/Párizs, Franciország