



SZENT ISTVÁN EGYETEM

**KÜLÖNBÖZŐ VEGYÜLETEK HATÁSÁNAK TÖBB GENERÁCIÓN KERESZTÜLI
VIZSGÁLATA A ZEBRADÁNIÓ (DANIO RERIO) EGYEDFEJLŐDÉSÉRE**

Doktori értekezés

Kovács Róbert

Gödöllő

2017

A doktori iskola

Megnevezése: Állattenyésztés-tudományi Doktori Iskola

Tudományága: Állattenyésztési tudományok

Vezetője: Dr. Mézes Miklós

egyetemi tanár, az MTA rendes tagja

Szent István Egyetem, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar,
Állattudományi Alapok Intézet, Takarmányozástani Tanszék

Témavezető: Dr. Urbányi Béla

egyetemi tanár, DSc, MTA doktora

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

Társtémavezető: Dr. Csenki-Bakos Zsolt Imre

tudományos munkatárs, PhD

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

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
Témavezető jóváhagyása

.....
Társtémavezető jóváhagyása

TARTALOMJEGYZÉK

1.	Jelölések, rövidítések jegyzéke.....	1
2.	Bevezetés és célkitűzések	5
3.	Irodalmi áttekintés.....	8
3.1	Gyógyszerek a természetes vizekben.....	8
3.2	A különböző gyógyszerek környezet-egészségügyi kockázatai	11
3.3	Különböző gyógyszerek a környezetben.....	12
3.3.1	Hormonkészítmények a környezetben	13
3.3.2	Antibiotikumok a környezetben	13
3.3.3	Koleszterinszint csökkentő gyógyszerek a környezetben	14
3.3.4	Nem-opioid fájdalomcsillapítók és nem-szteroid gyulladáscsökkentők a környezetben	15
3.3.5	Béta-receptor blokkolók a környezetben.....	16
3.3.6	Antidepresszánsok a környezetben	17
3.3.7	Antiepileptikumok a környezetben	17
3.3.8	Kontraszt anyagok a környezetben	18
3.3.9	Antineoplasztikus vegyületek a környezetben	18
3.4	Antineoplasztikus szerek.....	20
3.4.1	Az 5-fluorouracil	22
3.4.2	A cisplatin	24
3.4.3	Az etoposide.....	25
3.4.4	Az imatinib mesylate.....	26
3.5	Keverékek a környezetben	29
3.6	Ökotoxikológiai vizsgálatok gyógyszerhatóanyag keverékekkel	31
3.7	Halmodellek a toxikológiában	33
3.8	Zebradánió a toxikológiában.....	34
3.9	A zebradánió laboratóriumi tartása	35
3.9.1	Vízminőség.....	35
3.9.2	Takarmányozás.....	36
3.10	Akut toxicitás vizsgálatok halakon	37
3.10.1	Akut vizsgálat felnőtt halakon.....	38
3.10.2	Halembrió teszt (FET).....	38
3.11	Krónikus és szub-krónikus kitettség vizsgálata halakon.....	39
3.11.1	Korai életszakasz vizsgálat.....	40
3.11.2	Többgenerációs vizsgálatok	41
4.	Anyag és módszer	43
4.1	A kísérletek helyszíne, az állatok tartása	43
4.2	Felhasznált anyagok	43
4.3	Akut tesztek.....	44
4.3.1	Akut felnőtt hal teszt	44
4.3.2	Akut embrió tesztek	45
4.4	Keverék vizsgálatok az Imatinib és a Cisplatin esetében.....	45
4.4.1	Keverékek elkészítése	45
4.4.2	Prediktív keverék toxicitás	46
4.5	Szub-krónikus vizsgálatok fiatal zebradánió egyedeken	47
4.6	5-fluorouracil többgenerációs vizsgálata zebradánión.....	48
4.6.1	F0 generáció	49
4.6.2	F1 generáció	49
4.6.3	F2 generáció	51
4.6.4	Szövetteni vizsgálat.....	51

4.7	Imatinib multigenerációs vizsgálat	51
4.7.1	F0 generáció	52
4.7.2	F1 generáció	52
4.7.3	F2 generáció	52
4.8	Statisztikai értékelés	53
4.8.1	Akut vizsgálatok	53
4.8.2	Keverékek vizsgálata	53
4.8.3	Szub-krónikus vizsgálatok	53
4.8.4	Többgenerációs vizsgálatok	54
5.	Eredmények	55
5.1	Adult egyedek vizsgálata	55
5.2	A halembrió toxicitás teszt (FET) eredményei	55
5.2.1	5-fluorouracil	55
5.2.2	Cisplatin	58
5.2.3	Etoposide	58
5.2.4	Imatinib mesylate	59
5.2.5	Keverékek vizsgálatának eredményei	60
5.3	Szub-krónikus vizsgálatok	61
5.3.1	5-Fluorouracil	61
5.3.2	Imatinib mesylate	62
5.4	5-Fluorouracil többgenerációs vizsgálatának eredményei	64
5.4.1	Elhullás	64
5.4.2	F1 fiatal halak testparamétereinek vizsgálata a termékenyülés utáni 33. napon	64
5.4.3	F2 fiatal halak testparamétereinek vizsgálata a termékenyülés utáni 33. napon	65
5.4.4	F1 adult halak testparamétereinek vizsgálata hét hónappal a termékenyülés után	66
5.4.5	Szaporodásbiológiai vizsgálatok	67
5.4.6	F1 adult egyedek szövettani vizsgálata	68
5.5	Imatinib mesylate több generációs vizsgálatának eredményei	69
5.5.1	Elhullás	69
5.5.2	F1 fiatal halak testparamétereinek vizsgálata a termékenyülés utáni 33. napon	70
5.5.3	Az F2 generációba tartozó fiatal halak vizsgálata a termékenyülés utáni 33. napon	71
5.5.4	F1 felnőtt halak testparamétereinek vizsgálata a 10 hónappal a termékenyülésük után	72
5.5.5	Szaporodásbiológiai vizsgálatok	73
5.6	Új tudományos eredmények	75
6.	Következtetések és javaslatok	76
6.1	Következtetések	76
6.2	Akut vizsgálatok	77
6.2.1	Felnőtt halakon végzett vizsgálatok	77
6.2.2	Halembrió toxicitás tesztek (FET)	78
6.3	Keverékek vizsgálata	80
6.4	Korai életszakasz vizsgálatok	81
6.5	5-fluorouracil és cisplatin többgenerációs vizsgálatok	82
6.5.1	A mortalitás alakulása az F0, F1 és F2 generációkban	82
6.5.2	F1 és az F2 egyedek testparamétereinek alakulása a halak korai életszakaszában	84
6.5.3	F1 felnőtt egyedek testparamétereinek alakulása	85
6.5.4	Szaporodásbiológiai folyamatok	87
6.5.5	Szövettani vizsgálatok	88
6.6	Az antineoplasztikus vegyületek vizsgálatának általános értékelése	88
6.7	Javaslatok	89
7.	Összefoglalás	91
8.	Summary	93

9.	Melléletek.....	94
9.1	M1 Irodalomjegyzék	94
9.2	M2 Táblázatok.....	115
10.	Köszönetnyilvánítás	117

1. JELÖLÉSEK, RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

3R	Az állatkísérletek kiváltására, a felhasznált állatok számának csökkentésére és az állati szenvedés minimalizálására (Replacement-az állatmodellek helyettesítése, Reducement-a kísérleti állatok számának csökkentése, Refinement-az állati szenvedés minimalizálása) irányuló stratégia
5-FU	5-fluorouracil, antimetabolikus hatású gyógyszer vegyület
abl	Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1 gén
API	A gyógyszerkészítmények aktív, kívánt hatást kiváltó komponense (Active Pharmaceutical Ingredients)
ASV	A víz oxigén telítettségének kifejezésére szolgáló, %-ban kifejezett érték (Air Saturation Volume)
ATC kód	A gyógyszer vegyületek osztályozására kifejlesztett nemzetközi kódrendszer (Anatomical Therapeutic Chemical)
ATP	Adenizin-trifoszfát
BAF	Bioakkumulációs faktor, egy adott vegyület az élőlényben és a táplálékban mért koncentrációjának hányadosa (Bioaccumulation Factor)
BaP	Benzo(a)pirén
BBDR	Biológiai alapú dózis-hatás modellezés (Biologically Based Dose-Response Modelling)
BCF	Biokoncentrációs faktor, egy adott vegyület az élőlényben és a vízben mért koncentrációjának hányadosa (Bioconcentration Factor)
bcl2	B-cell lymphoma 2 gén
Bcr-Abl	Fúziós onkogén, maga géntermék az Abelson tirozin-kináz gén (Abl) és a „Breaking point” klaszter gén termékeinek fúziójakor jön létre. Akrónikus myeloid leukémia patogenezisében játszik szerepet.
CA	Koncentráció addíció (komplex anyagkeverékek hatásmechanizmusának egyik formája - Concentration Addition)
CAS szám	„Chemical Abstracts Service” regisztrációs szám
CisP	Cisplatin, platina tartalmú antineoplasztikus hatású gyógyszer vegyület.
cth	Cystathionine gamma-lyase gén
CYP3A4	Citokróm P-450 2 számú géncsalád, A alcsalád, 3 izoenzim

CYP3A5	Citokróom P-450 2 számú géncsalád, A alcsalád, 5 izoenzim
DOC	Oldott szerves szénvegyületek (Dissolved Organic Carbone)
dmrt1	Doublesex and mab-3 related transcription factor 1 gén
DNS	Dezoxiribonukleinsav (Deoxyribonucleic acid)
dpf	A hal embriók korának meghatározására szolgál és az ikra termékenyülésétől eltelt napokat adja meg (day post fertilization)
DMSO	dimetil-szulfoxid
EC ₁₀	Az a koncentráció, ami a vizsgált populáció 10%-nál vált ki hatást
EC ₅₀	Félhatásos koncentráció, ami az a koncentráció, ami a populáció 50%-nál vált ki hatást
EDC	Az endokrin rendszert megzavaró vegyületek (Endocrine Disrupting Compounds)
EMA	Európai Gyógyszerügynökség (European Medicines Agency)
EPA	Az Amerikai Egyesült Államok Környezetvédelmi Ügynöksége (United States Environmental Protection Agency)
EU	Európai Unió
ET	Etoposide, topoizomeráz gátló gyógyszer vegyület
F0	A kiindulási vagy szülő generáció, több generációs vizsgálatokban
F1	Az első, már a vizsgált során termékenyült ikrából származó generációs több generációs vizsgálatokban
F2	A második, már a vizsgálat során termékenyült ikrából származó generációs több generációs vizsgálatokban
FdUMP	5-fluoro-2'-deoxiuridine-5' monofoszfát
FdUTP	5-fluorouridin-5'-trifoszfát
FELS	A különböző vegyületek halak korai életszakaszára kidolgozott toxicitás vizsgálat (Fish Early-life Stage Test)
FET	Halembrió toxicitás teszt (Fish Embryo Toxicity Test)
FETAX	<i>Xenopus</i> béka embriókon alkalmazott teratológiai teszt (Frog Embryo Teratogenesis Assay Xenopus)
FUTP	5fluoro-'2-deoxiuridin-trifoszfát
GLP	Minőségbiztosítási rendszer a jó laboratóriumi gyakorlatért (Good Laboratory Practice)
hpf	Az ikra megtermékenyítését követő órák száma (hours post fertilization)
IA	Független hatás (Independent Action) (komplex anyagkeverékek hatásmechanizmusának egyik formája)

IC ₅₀	Egy vegyület speciális biológiai útvonal gátlás hatékonyságának kifejezésére szolgáló mutató (Half Maximal Inhibitory Concentration).
IM	Imatinib mesylate, egy protein-tirozinkináz inhibitor hatású antineoplasztikus farmakon.
kDA	Kilodalton, atomi tömegegység (dalton) 1000-szeres mennyisége, nagy molekulák és fehérjék mértékegységének leírására szolgál.
LC _x /LD _x	Az egyedek x%-ának pusztulását okozó koncentráció vagy dózis
LOEC	A hatás kiváltásához szükséges legalacsonyabb vizsgált koncentráció (Lowest Observed Effect Concentration)
log Kow	Oktanól-víz megoszlási koefficiens logaritmus értéke
MSZ EN ISO	Jóváhagyott magyar szabvány, a Nemzetközi Szabványügyi Testület (International Organization for Standardization) által létrehozott szabványokra.
NIH	Az Amerikai Egyesült Államok Nemzeti Egészségügyi Intézete (National Institute of Health)
NOEC	Az a legalacsonyabb vizsgált koncentráció, ami a tesztszervezetekben elváltozást még nem okoz (No Observed Effect Concentration)
OECD	Európai Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet (Organisation for Economic Co-operation and Development)
PEC	Becsült környezeti koncentráció (Predicted Environmental Concentration)
pKA	Savi disszociációs állandó, egy sav oldatbeli erősségének kvantitatív mértéke.
POC	Partikuláris szerves szénvegyületek (Particular Organic Carbon)
ppm	Megadja az adott komponens mennyiségét a rendszer millió (10 ⁶) tömeg-, térfogat-, vagy anyagmennyiség-egységében, ugyanazon egységben (parts per trillion)
Pt	Platina
REACH	Az Európai Unió anyagok regisztrációjára, vizsgálatára, engedélyezésére és korlátozására (Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals) vonatkozó irányelve
RNS	Ribonukleinsav (Ribonucleic acid)
rRNS	Riboszómális ribonukleinsav (Ribosomal ribonucleic acid)
rYES	Ösztrogén receptort kifejező, ösztrogén hatás vizsgálatára kifejlesztett élesztő-tesztrendszer (Recombinant Yeast Estrogen Screen)

VICH Veterinary International Conference on harmonization, Az EU, Japán és az Egyesült államok közös programja az állatgyógyászati készítmények szabályozásának összehangolására.

xrcc5 X-ray repair cross-complementing protein 5 gén

2. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

A különböző gyógyszerek fogyasztása ma már a mindennapjaink részévé vált. Ezek a vegyületek fontos szerepet játszanak az egészségünk megóvásában és egy magasabb életminőség fenntartásában. Várhatóan a gyógyszerek fogyasztása a jövőben tovább fog növekedni, részben a humán populáció globális növekedése, részben az emberek hosszabb élettartama miatt. A fogyasztással párhuzamosan pedig folyamatosan növekszik a környezetbe kerülő gyógyszerhatóanyagok mennyisége is.

Mivel gyógyszerhatóanyagok sok helyen előfordulnak, és folyamatosan jelen vannak a környezetben, így pszeudó perzisztens szennyezőknek nevezhetjük őket. Jelenlétük a környezetben már régóta ismert és erős biológiai hatással rendelkező vegyületek révén felmerült a kérdés: vajon milyen hatással lehetnek a vizekben és a talajban élő szervezetekre és végső során ránk, emberekre? Korábban a gyógyszerhatóanyagok környezetbe jutásának legfőbb forrásai a gyógyszergyárak elfolyóvizei voltak, ma már látható, hogy az új „zöldebb” gyártási technológiák jelentősen csökkentették az innen származó szennyezés mértékét. Sajnos azonban az elfogyasztott és a testünkől kiürülő, valamint az el nem fogyasztott és kidobott gyógyszerek mind nagyobb mennyiségben kerülnek a kommunális szennyvizekbe, illetve a hulladéklerakókból a talajba.

Az első vizsgálatok, még a 80-as, 90-es években a kémiai analitika eszközeinek fejlődésével először a környezeti koncentrációk meghatározására irányultak, majd ezen információk birtokában kezdődtek el az ökotoxikológiai, kockázatbecslési és kockázatkezelési vizsgálatok. Az eddigi vizsgálatok ellenére azonban még mindig nagyon kevés információ áll rendelkezésre a valós kockázat megismeréséhez és ez is leginkább csak néhány gyógyszer vagy gyógyszer csoportra terjed ki.

A farmakonok népes csoportjai közül a természetes vizekbe jutott antineoplasztikus vegyületek környezeti kockázatának vizsgálata is néhány évtizedre tekint vissza. Ez idő alatt elsősorban a különböző hatóanyagok jelenlétet mutatták ki kórházi és kommunális szennyvizekből, illetve nanogrammos tartományban néhány, szennyvizeket befogadó természetes vízfolyásból. Több vegyület erősen citotoxikus, genotoxikus vagy hormon háztartást zavaró hatású, így potenciális veszélyt jelentenek az élőlényekre és ennek következményei akár populáció szinten is megnyilvánulhatnak. A környezeti kockázatbecslések alapján azonban ezek a gyógyszerek alacsony koncentrációjuk, illetve sok esetben a rövid felezési idejük miatt nem minősülnek kockázatosnak.

A környezeti kockázatbecslési modellek elsősorban akut és egy-két hónapos krónikus vizsgálatokból állnak, valamint kémiai analitikai stabilitás vizsgálatok eredményein alapszanak. Tényleges hosszútávú tesztek nem alkalmaznak, habár egy gerinces modellen végzett teljes

életciklus, vagy több generációs vizsgálat sokkal árnyaltabb képet adhatna az antineoplasztikus hatású gyógyszerek tényleges környezeti kockázatáról.

A hosszú távú, akár többgenerációs ökotoxikológiai vizsgálatok fő gerinces modell szervezetei a halak. Mint gerinces szervezetek, alkalmazásuk egyik fő előnye, hogy egész életüket a vízben töltik, így folyamatosan ki vannak téve az itt megjelenő szennyező anyagoknak és azokat képesek egész testfelületükön felvenni. A hal modellszervezetek alkalmazásának másik fontos előnye, hogy a különböző laboratóriumi tesztekben használt fajok jól reprezentálják a szennyezőanyagok akvakultúrás rendszerekben tartott fajokra gyakorolt hatását is. Ennek a jelentősége különösen fontos, mivel a tógazdaságok sok esetben olyan vízbázisra épülnek, melyek befogadói a kommunális és az ipari szennyvizeknek. Az abban megjelenő gyógyszerhatóanyagok a termelés hatékonyságát is befolyásolhatják, vagy akár a feldolgozott állatok szöveteiben is megjelenhetnek. Habár ezek a xenobiotikumok mindig valamilyen keverék formájában jelennek meg a vizekben, nagyon fontos megismernünk, hogy az egyes vegyületek esetében külön-külön milyen hatásokkal kell számolnunk a környezeti koncentráció tartományokban.

A laboratóriumi halmodellek közül a zebradánió (*Danio rerio*) egyre elterjedtebben alanya nemcsak az akut, de a hosszútávú ökotoxikológiai vizsgálatoknak is. Mint lehetséges modell szervezetet, a halakra kidolgozott OECD és EPA toxicitás vizsgálatokban is javasolják. A fajt gyakran használják az OECD 210 szerinti halak korai életszakasz vizsgálatában, amely fontos része a humán és állatgyógyászati készítmények környezeti kockázatbecslésének. A zebradánió kifejllett egyedei és különösen az embriók szerepe várhatóan tovább fog nőni a különböző vegyületekre kiterjedő toxicitás vizsgálatokban az OECD 236 FET teszt protokoll 2013. évi megjelenésével. Ezen tesztek mellett pedig a jövőben várhatóan egyre nagyobb hangsúlyt fognak kapni a teljes életciklus vizsgálatok nem csupán farmakonok, de más biológiailag aktív vegyületek tanulmányozásában is. Jelenleg kidolgozott, többgenerációs toxicitás vizsgálati OECD protokoll medaka (*Oryzias latipes*) halfaj esetében érhető el. Ez a protokoll kifejezetten az EDC vegyület szaporodásbiológiai hatások vizsgálatára szolgál. Szükség volna azonban olyan átdolgozott módszerekre is, melyek más végpontokra, vagy szub-letális hatásokra fókuszálnának, mint pl. a genotoxicitás.

Vizsgálataim során négy különböző hatásmechanizmusú antineoplasztikus gyógyszerhatóanyag toxicitását vizsgáltam zebradánió modellen. Munkám célja volt az 5-fluorouracil, a cisplatin, az etoposide és az imatinib mesylate esetében is akut, szub-krónikus és krónikus kitétség mellett vizsgálni a vegyületek hatását az állatok embrionális és posztembrionális fejlődésre. Céлом volt meghatározni az akut tesztek során a vegyületek LC₅₀ értékeit felnőtt halakon és embriókon is. Vizsgálni kívántam ezen gyógyszerek keverékeinek akut letális hatását zebradánió embriókon.

Szub-krónikus kitétség során pedig az 5-FU és az IM esetében kívántam tanulmányozni a vegyületek hatását a zebradánió korai életszakaszában. Emellett pedig célom volt, kidolgozni egy tesztet, mely segítségével több generáción keresztül tanulmányozhattam az 5-fluorouracil és az imatinib toxicitását környezeti koncentrációhoz közeli tartományban is.

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1 *Gyógyszerek a természetes vizekben*

Az emberiség lélekszámának növekedésével és az életszínvonal, illetve az ezzel együtt járó átlagéletkor emelkedésével folyamatosan nő a gyógyszer felhasználás is (Kümmerer 2010). Ez a nagymennyiségű gyógyszerhatóanyag pedig az alkalmazásuk után eredeti formájukban, vagy metaboliként a kommunális szennyvizekbe, vagy a fel nem használt és a lejárt szavatosságú készítmények a kommunális hulladékba kerülnek. Ám nem csupán a humán gyógyszerfogyasztás növeli a környezetbe kijutó vegyületek mennyiségét, hanem az állatgyógyászati készítmények alkalmazása, a modern mezőgazdasági termelésben ugyancsak elterjedt, sok esetben a hozam fokozásának és a tenyésztés-technológiának az elengedhetetlen eszközei.

A humán felhasználásra szánt készítményekből nagy mennyiségű farmakon és azok metabolitja kerül ki a gyógyszergyárakból, a kórházakból és a háztartásokból (Christensen 1998). Ezen vegyületek jelentős része az ipari és a kommunális szennyvizekkel jut közvetve vagy közvetlenül a természetes vizekbe, továbbá a kommunális hulladéklerakókból a talajba.

Az állatgyógyászati készítmények speciális esetet képeznek, mivel ezek környezetbe jutása jóval direkter történik, mint a humán gyógyszerek esetében. Különösen jó példa erre az akvakultúrában és az extenzíven tartott állatállományok gyógyszeres kezelésében használt szerek csoportja (Christensen 1998). Ezekben az esetekben a farmakonok és metabolitok a leeresztett vízzel a befogadó természetes vízfolyásba, míg az extenzív tartású állatoknál a vizeletből és az ürüleből közvetlenül a talajba kerülnek.

Az utóbbi néhány évtizedben az egyre nagyobb tudományos figyelem mellett a közvélemény mind élénkebb érdeklődése is övezi a természetben megjelenő gyógyszerhatóanyagokat és azok negatív hatásait az ökoszisztémára. Az elmúlt 20-25 évben folyamatosan nőtt az irodalomban azon munkák száma, melyek ezen szennyezők mind nagyobb mennyiségű megjelenésére hívják fel a figyelmet. Ezek a vészjósló hangok azonban nem kaptak túl nagy figyelmet egészen a 90-es évek végéig, mikor is Velagaleti (1997), Halling-Sørensen et al. (1998), Raloff (1998), Christensen (1998), valamint Daughton és Ternes (1999) nagy hatású munkái rá nem világítottak a helyzet súlyosságára. Ezért az utóbbi időben környezeti analitikai és ökotoxikológiai vizsgálatok mellett a környezeti kockázat becslése és a lehetséges megoldások keresése is fontos vizsgálati céllá vált.

Maguk a gyógyszerkészítmények egy vagy több API-t tartalmaznak, melyek mellett számos segéd- és vivőanyag, szerves és szervetlen savak, színezékek és egyéb anyagok is megtalálhatóak. Ezek a hatóanyag stabilizálásában vagy éppen a felszívódásának

megkönnyítésében játszanak szerepet. A kísérővegyületek, melyeknek mennyisége sokszor a többszöröse egy készítményben az aktív hatóanyagának, környezeti kockázata nagyon kicsi, vagy éppen egyáltalán nem jelentenek kockázatot az ökoszisztémára. Ennek elsődleges oka kémiai struktúrájukból fakad, hiszen vagy a felszívódás során lebomlanak, vagy a környezetbe kerülve válnak veszélytelenné, esetleg olyan anyagok, melyek egyáltalán nem rendelkeznek biológiai aktivitással. Azt is meg kell ugyanakkor jegyeznünk, hogy nagyon keveset tudni a kísérőanyagok tényleges környezeti viselkedéséről és hatásukról, hiszen szinte kizárólag valamely hatóanyag vonatkozásában vizsgálják ezeket (Kümmerer 2010). Ám mivel ezen anyagok igen nagy mennyiségben juthatnak ki a környezetbe, mindenképpen érdemes volna legalább a víz és a talajlakó mikrobiológia társulásokra gyakorolt hatásukat felmérni, hiszen egyes baktérium vagy gomba törzsek számára tápanyagforrást jelenthetnek, vagy éppen szelektív toxikus hatásuk befolyásolhatja a mikrobiom összetételét.

Az aktív hatóanyagok kémiai szempontból igen változatosak. Sok vegyület például alacsony, vagy neutrális pH környezetben egészen eltérően viselkedhet. Az alacsony disszociációs állandóval bíró (pKa) molekulák biológiai hozzáférhetőségét, vagy más molekulákhoz való kötődésük affinitását a pH jelentősen meghatározza.

Gyakran a hatóanyag kémia struktúrájában végbemenő jelentéktelennek tűnő változás is jelentős hatással lehet a molekula szerkezeti, vagy környezeti viselkedésére (Cunningham 2008). A terápia során elfogyasztott gyógyszerhatóanyagok jelentős részének kémiai szerkezete megváltozik az emberi és az állati szervezetben, melynek eredményeként egy molekulából több különböző szerkezetű metabolit is keletkezhet. Fontos kérdés, hogy mi történik azokkal a biotranszformáció II. fázisán átesett molekulákkal, melyeken glükoronil, szulfát, metil vagy glutation csoportjait a baktérium és gomba törzsek képesek eltávolítani, aminek hatására a molekula újra aktívvá válik (Kümmerer 2010). Erre példa a glükoronsavval konjugálódott vegyületek, melyek a szennyvízben a bakteriális aktivitás után újra szabad formában jelenhetnek meg (Kümmerer 2010). Az előgyógyszerek, - mint a capacetabin, ami a 5-FU elővegyülete - külön kérdéskört alkotnak a gyógyszerhatóanyagok környezetben való viselkedésének tanulmányozásán belül. Habár ezek a vegyületek az emberi sejtekben zajló enzimikus folyamatok révén válnak aktív vegyületté, azonban a kiürült előgyógyszer a környezetben is aktiválódhat a lebontó szervezetek által (Kümmerer 2010, Straub 2010a).

A metabolitok a kiindulási vegyülettel együtt a kiválasztás során ürülnek ki a szervezetből. Az egyes vegyületek metabolizációjának mértéke igen változó, míg egyes antibiotikumok 95%-a átalakul a szervezetben, másoknak csak 5%-ával történik meg ugyanez. Egy Németországban végzett felmérés szerint, a felhasznált antibiotikumok 75%-a változatlanul, aktív formájában ürül ki a szervezetből (Kümmerer és Henninger 2003). Nem meglepő hát, ha gyógyszer

anyamolekulák esetében is még mindig igen hiányosak az ismereteink a környezeti viselkedés és a környezeti kockázat tekintetében.

Egyre több olyan farmakon van, melyet valamilyen biotechnológiai eljárással hoznak létre egy természetes molekula megváltoztatásával (pl. egyes fehérjék, nukleinsavak, rekombináns humán inzulin). Straub (2010b) eredményei alapján úgy tűnik, hogy a legtöbb ilyen vegyület metabolizálódik az emberi testben, vagy lebomlik a szennyvízben, így számottevő kockázatot az aktív molekula nem jelent a környezetre.

A már kiválasztott kiindulási molekulákat és a metabolitokat a környezetben számos fizikai, kémiai és biológia hatás éri, számos biotikus és abiotikus folyamaton mennek keresztül, melyek további változásokat eredményeznek a kémiai szerkezetükben. A környezetben megjelenő gyógyszerhatóanyagok így folyamatosan változhatnak a baktériumok és gombák anyagcsere folyamatai révén (Haiß és Kümmerer 2006, Gröning et al. 2007, Trautwein et al. 2008). A biotikus tényezők közül a gombák szerepe elsősorban a talajban zajló folyamatokban a hangsúlyosabb. A tengerekben, felszíni és felszín alatti vizekben, valamint a szennyvizekben elsősorban a baktériumok végzik a bontás legnagyobb részét. Ennek mértéke és sebessége persze függ a baktériumok számától és a törzsétől, illetve a hőmérséklettől is (Kümmerer 2010). Az abiotikus tényezők közül a napsugárzás, az ionösszetétel és a hőmérséklet, valamint a pH közvetlenül befolyásolja a vegyületek degradációját, illetve hatással van a mikrobiális közösség összetételére is (Dalrymple et al. 2007). A környezeti tényezőkön kívül a különböző szennyvízkezelés során végbemenő folyamatok is, mint az oxidáció, hidrolízis és a fotolízis további struktúrális változásokat okozhatnak a gyógyszerhatóanyagokban, illetve metabolitjaikon (Ravina et al. 2002, Zühlke et al. 2004, Lee et al. 2007, Pérez-Estrada et al. 2007, Méndez-Arriaga et al. 2008). Az így létrejött vegyületek egészen új tulajdonságokkal rendelkezhetnek, tehát megismerésük a környezet- és a humán egészség szempontjából is fontos kérdést jelent. Sok esetben a keletkezett metabolitok toxicitása kisebb, mint a kiindulási vegyületeké, azonban ez nincs mindig így. Különösen jó példa erre az előgyógyszerek csoportja, melyekből nagyon sokszor a fotolízis és az oxidáció révén mutagén és erősen toxikus hatású vegyületek keletkezhetnek (Isidori et al. 2005a, DellaGreca et al. 2007, Isidori et al. 2007, Lee et al. 2007, Calza et al. 2008, Méndez-Arriaga et al. 2008).

Az anya, vagy épp a metabolit molekulák eltávolításának legfőbb módja a környezetből a vegyületek megkötése (melyre jó példa a tetraciklin és a quinolone antibiotikumok csoportja) és (bio)degradációja (Golet et al. 2002). A degradációs folyamatok közül az előző bekezdésben már említett hidrolízis és a fotolízis a két legjelentősebb, mely egyaránt lezajlik a felszíni vizekben és fontos eleme a szennyvíztisztítási technológiáknak is. A molekulák megkötődése egyrészt csökkenti azok eloszlását a víztestben, másrészt pedig ugyancsak csökkenti a vegyület

hozzáférhetőségét az élőlények számára (Kümmerer 2010). Az apoláros és poláros vegyületek egyaránt kötődhetnek -bár különböző mértékben- az oldott szerves molekulákhoz (DOC), mint például a huminsavakhoz, vagy a szuszpendált szerves anyagokhoz (POC). Mindkét esetben a molekula elveszti aktivitását, ugyanakkor a kimutathatósága is csökken az analitikai mérések során. A megkötött oldott vegyületek nagy affinitással diffundálnak aztán biofilmekbe (Kümmerer 2010). Maskaoui és Zhou (2010) vizsgálatai rámutattak arra, hogy az édesvizekben található kolloidok milyen fontos szerepet játszanak a különböző gyógyszer molekulák megkötésében. A kötött formában jelenlévő már inaktív vegyületek koncentrációja így akár a többszöröse is lehet a szabadon lévő molekuláknak és jelentősen befolyásolják a felvehetőség, valamint a bioakkumuláció mértékét (Maskaoui és Zhou 2010).

A különböző, aktív gyógyszerhatóanyagokat már számos helyen kimutatták, mint kórházi elfolyóvizekben, hulladék lerakókban, kommunális szennyvíziszapban, de felszíni és felszín alatti vizekben, tengerekben és ivóvízben is (Daughton és Ternes 1999, Kümmerer 2001, Heberer 2002, Kümmerer 2009a). Megfigyelhető továbbá egy erős szezonális is a szennyvíziszapban, illetve a tisztított szennyvizekben megjelenő vegyületekben (Alexy et al. 2006, Loraine és Pettigrove 2006). Számos humán- és állatgyógyászatban alkalmazott farmakont megtaláltak sarkvidéki vizekben is (Kallenborn et al. 2008), így látható, hogy a vizek érintettsége nem csupán az ember által sűrűn lakott övezetekre terjed ki. Legtöbbször ezen vegyületek mennyisége a felszíni vizekben csupán ng/l és µg/l tartományban mutatható ki. Néhány esetben még egyes pszichoaktív és hallucinogén drogok (amfetaminok, metadon, kokain és ezek metabolitjai stb.) jelenlétét is sikerült kimutatni a kommunális szennyvizekből (Zuccato et al. 2005b, Boleda et al. 2007).

A vizekbe kerülő gyógyszerhatóanyagok és metabolitjaik környezeti kockázatáról egyre több adat áll rendelkezésre, ám még mindig sok terület van, ahol hiányosak az ismereteink, mint például a hosszú távon, populáció szintjén megjelenő következmények. Emellett pedig meg kell említeni, hogy a környezetben mindig keverékként jelen lévő vegyületek koncentrációja térben is időben is eltérő, ami tovább nehezíti a pontos kockázat megismerését. A keverék egyes elemei pedig hatással lehetnek a másik felszívódására, vagy éppen a biológiai hatás megnyilvánulására. Ezeknek a kapcsolatoknak a megismerése pedig további fontos témája kell, hogy legyen a környezeti kockázat felmérésének.

3.2 A különböző gyógyszerek környezet-egészségügyi kockázatai

A környezetbe kerülő gyógyszer-molekulák emberi egészségre gyakorolt kockázata sokkal inkább környezet higiéniai, mint toxikológiai kérdés (Jones et al. 2004). Bár vannak kivételek is, mit például azok a hormon hatású anyagok (EDC) és hormonok, melyek aktivitásuk okán nagy

affinitással kötődnek a receptorokhoz és ezzel okoznak zavarokat az endokrin folyamatokban (Länge et al. 2001, Kidd et al. 2007, Hannah et al. 2009). A hormon hatású vegyületek mellett az egyes daganatos megbetegedések terápiájában használt gyógyszereknek is már régen ismert a kis dózisban lehetséges rákkeltő hatása (Lien és Ou 1985). Ugyancsak ismert az egyes környezetben megjelenő antibiotikumoknak a humán egészségre gyakorolt közvetett hatása. Ezen vegyületeknek nagy szerepe van az antibiotikumrezisztens baktérium törzsek kialakulásában (Kümmerer 2009b).

Ha a humán kitettség oldaláról vizsgáljuk meg a vizekben, így az ivóvízben is megjelenő gyógyszer hatóanyagok kérdését, láthatjuk, hogy még 2 literes napi és 70 évig tartó fogyasztással sem érjük el a terápiás dózist. Nem szabad viszont elfelejteni, hogy a rövid vagy hosszútávú terápiás adagolás esetében meghatározott mellékhatások és egyéb tünetek nem egyértelműen azonosak egy évekig tartó alacsony koncentrációjú kitettséggel. Ugyancsak fontos hangsúlyozni, hogy ezek a hatások nem ugyanolyanok egy egészséges felnőtt, egy magzat, egy csecsenő vagy egy idős ember esetében. Egy másik jelentős probléma, hogy a vizekben minden esetben változó arányban és összetételben, keverékként vannak jelen a különböző anyagok (Kümmerer 2010). Ezek miatt mind a mai napig megoldatlan kérdése a toxikológiának, az ökotoxikológiának és az epidemiológiának a különböző nagy, terápiás dózisú és rövid távú tesztekől származó eredmények extrapolálása az ivóvízzel történt kis dózisú, viszont hosszú távú kitettségre. Ugyancsak mindezidáig megoldatlan kérdés a gyerekek, a terhes nők és az idősek esetében a kockázat meghatározása, hiszen a legtöbbször nem ők a hagyományos kockázat felmérés alanyai (Collier 2007, Kümmerer és Al-Ahmad 2010).

3.3 *Különböző gyógyszerek a környezetben*

A különböző aktív gyógyszerhatóanyagoknak az ökoszisztémára gyakorolt hatásáról szerzett tudásunk folyamatosan nő, azonban még mindig igen hiányosak az ismereteink (Fent et al. 2006) és ez sajnos az elmúlt 10 évben sem változott. Baktérium (*Bacteria*), alga (*Viridiplantae* és *Cyanobacteria*) és vízibolha (*Daphnia sp.*), valamint halfajok (*Pisces*) esetében is bizonyították már, hogy alacsony koncentráció mellett a hosszú távú kitettség hatással van a vízi szervezetekre (Lützhøft et al. 1999, Yamashita et al. 2006). A diclofenac esetében például a szennyvizekben mért koncentráció nagyon közel van a krónikus kitettség mellett megfigyelt toxicitás szintjéhez (Schwaiger et al. 2004, Hoeger et al. 2005, Triebkorn et al. 2007). A propranolol és a fluoxetin esetében pedig a szennyvízkezelők elfolyó vizeiben mért maximális koncentráció megközelítette a krónikus toxicitási szintet is (Fent et al. 2006). A felszíni vizekben a különböző gyógyszerek koncentrációja alacsonyabb, mint a fenti vizsgálatokban mért értékek, azonban ez még mindig kockázatot jelent. A tényleges, terepi ökotoxikológiai vizsgálatok száma alacsony, habár ezek

adhatják a legjobb képet a felszíni vizek állapotáról (Fent et al. 2006). A laborkörülmények között végzett krónikus vizsgálatok bár fontosak a hatásmechanizmusok megértése végett, sokszor azonban ezek az összefüggések nem mindig igazolhatók az ökoszisztéma szintjén.

3.3.1 Hormonkészítmények a környezetben

A szteroid vegyületek voltak az elsők, melyeket kimutattak az elfolyó szennyvizekben (Aherne és Briggs 1989, Shore et al. 1993) és így ezek kapták és kapják mind a mai napig az egyik legnagyobb figyelmet az ökotoxikológia területén. Az ösztrogén hatású készítményeket, elsősorban szintetikus xenoösztrogéneket, igen elterjedten használják az ösztrogén terápiák során, illetve fogamzásgátló szerek hatóanyagaként, de igen jelentős az állatgyógyászati felhasználásuk is (Daughton és Ternes 1999). A fogamzásgátlókban alkalmazott 17α -ösztradiolt ugyan csak 7 ng/l-nél kisebb koncentrációban mutatták ki Desbrow et al. (1998) szennyvíztisztítók elfolyóvizében, azonban feltételezhetően a más ösztrogén vegyületekkel, mint a 17β -ösztradiol és az ösztron együttesen felelősek a hím halak vitellogenin termeléséért. Halpopulációk esetében először a 80-as évek közepén figyelték meg az ivareltolódást szennyvizekkel terhelt lagúnákban (Routledge et al. 1998). Az ösztrogén származékok hatásának vizsgálata a vízi szervezetek reprodukciós képességeire és a populációk szerkezetére a mai napig egy fontos kutatási terület (Kidd et al. 2007, Vajda et al. 2008, Wedekind 2014). Természetesen nem csak ösztrogén hatású hormon készítmények kerülnek a vizekbe, azonban az androgén, illetve a tiroxin származékokról jóval kevesebb ismerettel rendelkezünk. Elmondható azonban, hogy szteroid típusú gyógyszerhatóanyagok erősen zsírolékonyak, ezért jól kötődnek szennyvizekben lévő szerves vegyületekhez. Emiatt egy jelentős részük megkötődik a szennyvíz kezelés során és kötött formában az iszapba kerül. Azonban még az elfolyó vizekben megjelenő alacsony koncentráció mellett is képesek ezek az anyagok jelentős élettani hatásokat kiváltani a vízi szervezetekben.

3.3.2 Antibiotikumok a környezetben

Az összes gyógyszer csoport közül talán az antibiotikumok környezetben való megjelenése kapta a legtöbb figyelmet az elmúlt években. Ezek a vegyületek több forrásból is a környezetbe kerülhetnek és a humán gyógyszereken túl, az állatgyógyászatból, az állattenyésztés során felhasznált és az akvakultúrában alkalmazott készítmények jelentik a legfőbb szennyezőket. Egy vizsgálat során kórházi elfolyó vizekben az ismert DNS károsító fluoroquinolon-t és 3-87 $\mu\text{g/l}$ -es koncentrációban ciprofloxacint találtak (Hartmann et al. 1998). Még a 90-es évek végén Hirsch et al. (1999) németországi elfolyó szennyvizekben, felszíni és felszín alatti vizekben

összesen 18 antibiotikumot mutatott ki, melyek között macrolid, szulfonamid, penicillin és tetraciklin vegyületek is megtalálhatóak voltak. A penicillinek (könnyen hidrolizál) és a tetraciklinek (nagy affinitással kötődik a kalciumhoz és más kationokhoz) kivételével a többi vegyületcsoport mikrogrammos mennyiségben volt megtalálható. Ezek a molekulák toxikus hatásukon túl sokkal súlyosabb problémákat okoznak az antibiotikum rezisztens baktérium törzsek megjelenésével. Szennyvíztisztító telepeken túl, már találtak rezisztens baktériumokat például Vietnámban csatornáknak és tavakban is (Hoa et al. 2011, Bouki et al. 2013). A haltenyésztéssel foglalkozók számára ez különösen nagy probléma, hiszen a kórokozók rezisztensé válhatnak, mint ahogy ezt Hatha et al. (2005) megfigyelték *Aeromonas* törzsek esetében.

A különböző antibiotikumok ökotoxikológiai vizsgálata során számos eredmény született az antibiotikumok nem célszervezetekre gyakorolt hatásáról, ám ezek a vizsgálatok többsége nem a környezeti koncentrációkkal vagy mintákkal készült. Andreozzi et al. (2004) az amoxicillin toxicitását vizsgálták különböző alga fajokon a környezeti minták biotikus és abiotikus degradációs folyamatai figyelembevételével. Eredményeik alapján látható volt, hogy a *Pseudokirkneriella subcapitata*, *Closterium ehrenbergii* (zöldalga) és a *Cyclotella meneghiniana* (kovaalga) fajok számára a környezeti koncentrációk mellett az amoxicillin nem bizonyult kockázatosnak, míg a *Synechococcus leopolensis* cianobaktériumra igen. Az erythromycin, oxytetracyclin, sulfamethoxazole, ofloxacin, lincomycin és clarithromycin esetében algákon, kerekeshéjűek (Rotifera) és vízibolhák (Daphnia magna) végzett vizsgálatok során a makrolid antibiotikumok bizonyultak a legkockázatosabbnak a vízi szervezetekre (Isidori et al. 2005b). A fluoroquinolonokon végzett tesztek nagy vízibolhán (*Daphnia magna*) (48 órás kitétség) a túlélés, míg a tűzcsellén (*Pimephales promelas*) (7 napos kitétség) a túlélés és a növekedés tekintetében kis mértékű toxicitást mutattak még a 10 mg/l-es koncentrációban is (NOEC). Ugyanakkor a halak száraz testtömege szignifikánsan nagyobb volt a 10 mg/l-el ciprofloxacin-al, levofloxacin-al és ofloxacin-el kezelt egyedeknél, mint a kontroll csoportnál (Robinson et al. 2005). Eredményeik alapján az 1 µg/l- ben a vizsgálat vegyületekre meghatározott környezeti koncentráció egyedül a *M. aeruginosa* cianobaktérium faj számára jelent környezeti kockázatot, ellenben ezen vegyületek szelektív toxicitása komolyan befolyásolhatja a vízi ökoszisztéma fajstruktúráját.

3.3.3 Koleszterinszint csökkentő gyógyszerek a környezetben

A klofibrát az egyik leggyakoribb koleszterinszint csökkentő gyógyszer, így ez egyike volt a legelsőként szennyvizekből kimutatott vegyületeknek (Stan és Heberer 1997) is. Aktív metabolitjának, a klofibrin savnak a kémiaszerkezete nagy hasonlóságot mutat a herbicidként

alkalmazott mecoprop-al, ezért különösen nagy figyelem övezte a környezetanalitikai vizsgálatokban (Daughton és Ternes 1999). Heberer et al. (1998) a berlini vizeket vizsgálva 10 és 165 ng/l-es koncentrációban mutatták ki a vezetékes ivóvízből a klofibrin savat. Ugyancsak Heberer és Stan (1997) szennyvíztisztító telepek után gyűjtött felszíni vízmintákban 4 µg/l koncentrációban mutatta ki a klofibrin savat, míg vezetékes víz esetében 270 ng/l mértek. Ezek alapján látható, hogy a legtöbb szennyvíztisztítási technológia nem képes eliminálni a klofibrát metabolitját.

Svájci, vidéki és városok melletti tavakból gyűjtött vízmintákban 1-9 ng/l koncentrációban mutattak ki klofibrin savat, míg ugyanezekben a vizekben a mecoprop mennyisége 8-45 ng/l volt (Buser et al. 1998a). Mikor a hegyekben található tavak vízmintáját vizsgálták, a kimutatási határértéken sem tudták igazolni a két anyag jelenlétét, így kizárható az atmoszférán keresztüli szennyeződés lehetősége ezeknél a vegyületeknél. Ugyanebben a vizsgálatosorozatban az Északi-tengerből vett minták vizsgálatkor 7,8 ng/l-es koncentrációban mutatták ki a klofibrin savat és valamivel alacsonyabb 2,7 ng/l-es mennyiségben a mecoprot.

Stumpf et al. (1999) Braziliában gyűjtött vízmintákban a klofibrin/fenofibrát, bezafibrate és a gemfibrozin esetében az elimináció mértékét 6-50% között határozták meg. Ez alapján látható, hogy még trópusi égövön is igen kismértékű ezen vegyületek bomlása. Az igen perzisztens gyógyszer-molekulák terápiás dózisa sokszor grammos napi bevittet ír elő, így igen nagy mennyiségben kerülnek ezek a vegyületek a kommunális szennyvizekbe.

Mivel nagy mennyiségben használják ezeket a perzisztens vegyületeket, ezért különösen fontos megismerni a vízi szervezetekre gyakorolt hatásukat. Pontyféléken (*Cyprinidae*) végzett vizsgálatokban 100 µg/l-es kitettség mellett a vérplazma biokémiai és ionregulációs paramétereiben találtak szignifikáns változásokat a klofibrinnel kezelt csoportoknál (Saravanan et al. 2011, Saravanan és Ramesh 2013, Saravanan et al. 2014). Szúnyogírtó fogasponty (*Gambusia holbrooki*) vizsgálatokor 295 µg/l-es krónikus kitettség mellett a hímek testtömegének szignifikáns csökkenését figyelték meg (Nunes et al. 2004).

3.3.4 Nem-opioid fájdalomcsillapítók és nem-szteroid gyulladáscsökkentők a környezetben

A fájdalomcsillapítók és a gyulladáscsökkentők piacán a felhasználás tekintetében igen előkelő helyen állnak a nem-opioid fájdalomcsillapítók és a nem-szteroid gyulladáscsökkentők. A nagy mennyiségű felhasználás fő oka, hogy ezen hatóanyagok számos, nem vényköteles készítményben megtalálhatóak, így a kommunális szennyvizekkel is jelentős mennyiségben kerülnek ki a környezetbe. Ternes (1998) vizsgálati során szennyvíztelepek elfolyóvízeiben keresett diclofenacot, indometacint, ibuprofent, naproxent, ketoprofent és a fenazont, és mind a 6 hatóanyag esetében 1 µg/l-et maghaladó mennyiségben találta meg őket. A ketoprofen

kivételével pedig ezek a vegyületek a felszíni vizekben is kimutathatóak voltak, igaz több nagyságrenddel kisebb mennyiségben.

A Berlin környéki vizek vizsgálatok Heberer et al. (1998) által végzett analízisekben a klorofibrát mellett a leggyakrabban kimutatott gyógyszerhatóanyagok a nem-szteroid gyulladáscsökkentők (ibuprofen, a diclofenac és a proifenazon) voltak. Az ibuprofen és a diclofenac pedig a felszíni vizekben és az ivóvízben is kimutatható volt. A diclofenac esetében (Buser et al. 1998b) kimutatták, hogy bár a szennyvíztisztítás során az elimináció mértéke alig volt 50%, addig felszíni vizekben a befolyónál a mért 11-310 ng/l-es koncentráció 1-12 ng/l-re csökkent rövid időn belül, melynek legfőbb oka feltételezhetően a fotodegradáció. Az ibuprofen vizsgálatok a szennyvíztisztítóba befolyó vízben mért 1-1,3 µg/l-es koncentráció a kifolyási pontnál már csak néhány ng/l volt, ami a vegyület kisebb stabilitását mutatja a tisztítási technológia során (Buser et al. 1999).

Az Elba vízgyűjtőjéhez tartozó felszíni vizekből vett mintákban cseh kutatók maximális koncentrációként az ibuprofennél 3210 ng/l-t, diclofenacnál és a ketoprofenél 1080 ng/l-t és 929,8 ng/l-t mutattak ki. Ilyen magas, élővizekben mért értékek mellett nem meglepő, ha vízi szervezetekben is megjelennek ezek a gyógyszerhatóanyagok. Brozinski et al. (2013) kommunális szennyvízzel terhelt kis folyóból származó dévérkeszegek (*Abramis brama*) és bodorkák (*Rutilus rutilus*) epéjében mutatta ki az diclofenacot, naproxánt és az ibuprofent 6-95 ng/ml, 6-32 ng/ml és 16-34 ng/ml, illetve 44-148 ng/ml, 11-103 ng/ml és 15-26 ng/ml mennyiségben.

3.3.5 Béta-receptor blokkolók a környezetben

A béta-receptor blokkolókat többek között különböző szívritmuszavarok és magas vérnyomás kezelésére alkalmazzák, mely tünetek a nyugati társadalom egyre nagyobb hányadát érintik. Éppen ezért a kommunális szennyvizekben is növekszik ezeknek a szereknek a mennyisége. Huggett et al. (2003) mérései során a szennyvíz mintákból 1,9 µg/l-es koncentrációban mutatták ki a propranololt, valamint a minták több mint 70%-ban a metoprolol és a nadolol is kimutatható volt több mint 1,2 µg/l és 0,36 µg/l-es koncentrációkban. Az olaszországi Lambro folyóban pedig az atenolol jelenlétét 241 ng/l-es mennyiségben igazolták (Zuccato et al. 2005a).

A propranolol és a metoprolol vízi szervezetekre gyakorolt hatását Huggett et al. (2002) vizsgálták, mely során 48 órás kitettség során meghatározott LC₅₀ érték nagy vízibolha esetében 1,6 és 63,9 mg/l volt. *Ceriodaphnia dubia*-n végzett akut teszt esetében az LC₅₀ értéke 0,85 és 8,8 mg/l volt. Medakán végzett 4 hetes reprodukciós vizsgálat során pedig a 0,5 µg/l-es koncentrációnál igazolhatóan csökkent a lerakott ikrák száma, valamint a lárvák kelési aránya (Huggett et al. 2002).

3.3.6 Antidepresszánsok a környezetben

A szelektív szerotonin-újrafelvételt gátló hatású vegyületek az egyik legfontosabb csoportja az antidepresszánsoknak, melyek közé a Prozac, a Zoloft, a Luvox, a Cipralex és a Paxil hatóanyaga is tartozik. Ezek a legelterjedtebben és leggyakrabban használt gyógyszerek közé tartoznak (Daughton és Ternes 1999). Kolpin et al. (2002) az Egyesült Államokban 139 vízfolyást vizsgáltak meg és ezeknek csupán 1,2%-ban mutatták ki a fluoxetin. Egy másik vizsgálatban 0,62 µg/l-es koncentrációban mutatták ki a citalopramot olyan vizekben, melyekbe kórházból származó tisztított szennyvíz ömlött (átlagos mennyisége 0,01 µg/l volt)(Vasskog et al. 2008). A vizekbe jutott fluoxetin jelentős része a kommunális szennyvizekből származik, mivel az emberi szervezetből a 11%-a a felvett mennyiségnek kiürül és 7%-a aktív metabolitként távozik (DeVane 1999). A környezetbe került fluoxetin igen stabil, mivel rezisztens a fotokatalízissal és a hidrolízissal szemben (Kwon és Armbrust 2006).

Az antidepresszánsokkal foglalkozó irodalomban elsősorban a fluoxentinhez kapcsolódóan található adatok a nem cél szervezetekre gyakorolt különböző élettani hatásokról. Vándorkagyló (*Dreissena polymorpha*) esetében megfigyelték, hogy néhány mikrogrammos koncentrációban is indukálja az állatok ivartermékének leadását, valamint az oocyták érését (Fong 1998). Halak esetében bizonyították a vegyület szaporodásbiológiai hatását, e mellett befolyásolja az állatok viselkedését is (Mennigen et al. 2011).

3.3.7 Antiepileptikumok a környezetben

Az antiepileptikumok közül a karmamazepin fordul elő leggyakrabban a szennyvizekben és a felszíni vizekben (Daughton és Ternes 1999). Tixier et al. (2003) svájci szennyvíztelepek elfolyó vizeiben és a befogadó folyóból gyűjtött mintákban vizsgálták több gyógyszer jelenlétét. Az értékelés során 0,95 µg/l-es átlagos koncentrációban mutatták ki a karmamazepint a szennyvíztelepek elfolyóiban. Vizsgálatukban megállapították továbbá, hogy a vegyület meglehetősen perzisztens a felszíni vizekben. A karmamazepin perzisztenciáját és bioakkumulációs képességét bizonyítja az a vizsgálatsorozat is, melyben labor körülmények között vizsgálták tüzesellén és csatorna harcsán (*Ictalurus punctatus*) a vegyület akkumulációját (Garcia et al. 2012). Az eredmények alapján a halak fehérizom szövetében és májában 1,9 és 4,6, valamint 1,8 és 1,5 biokoncentrációs faktor értéket (BCF) kaptak. Eredményeiket összevetették terepi vizsgálatokkal is, ahol nilusi tilápiából (*Oreochromis niloticus*) származó mintákban is hasonló bioakkumulációs faktor (BAF) értékeket kaptak (2,5–3,8).

A karbamazepin teratogén hatásának vizsgálatakor zebradánió embriók csökkent növekedését tapasztalták 30,6 mg/l-es koncentráció felett (van den Brandhof és Montforts 2010) és megállapították, hogy az embriókon megjelenő deformitások nagyban hasonlítanak a patkányokon (*Rattus norvegicus*) leírt teratogén hatásokra.

3.3.8 Kontraszt anyagok a környezetben

A diagnosztikai képalkotás során használt kontraszt vegyületek bár nem tekinthetők aktív hatóanyagoknak, azonban nagy mennyiségű kórházi használata miatt, mindenképpen indokoltnak tartottam megemlíteni ezt a csoportot.

A röntgenes képalkotás során a lágy szövetek jelölésére általában valamilyen jódozott aromás vegyületet használnak, mint a diatrizoat és iopromid. Ezen vegyületekből az éves felhasználás világviszonylatban meghaladja a 3000 tonnát (Kalsch 1999). Vizes környezetben ezek a vegyületek igen perzisztensek és a szennyvízkezelési eljárások során sem transzformálódnak.

Szennyvízkifolyókból gyűjtött mintákban Ternes és Hirsch (2000) 15 µg/l-es koncentrációban mutatta ki az iopamidolt és 11 µg/l volt az iopromid mennyisége. Egy Frankfurt melletti szennyvíztisztító telepen további két kontraszt anyagot, a diatrizoatot és az iomeprol-t mutatták ki 8,7 µg/l-es mennyiségben. Felszíni vizek vizsgálatakor 49 µg/l volt a medián értéke az iopamidol-nak és 0,23 µg/l a diatrizoat-nak. A talajvíz esetében a jódozott kontraszt vegyületek maximális koncentrációja elérte a 2,4 µg/l-t.

A nagy mennyiségben történt felhasználás mellett meg kell említeni, hogy ezek a vegyületek nagyon gyengén metabolizálódnak az emberi szervezetben és több mint 95%-a a kiindulási molekulának kiürül a szervezetből, azonban gyakorlatilag nincs bioakkumulációs potenciáljuk és toxicitásuk is nagyon alacsony (Steger-Hartmann et al. 1998).

Az iohexol, iotrolan, diatrizaot és az iopromide akut toxicitás vizsgálatok során Steger-Hartmann et al. (1998) sem baktériumok (*Vibrio fisheri*), sem algák (*Scenedesmus subspicatus*), sem pedig vízibolhák esetében nem tapasztaltak mérgező hatást. A zebradánión és jászkeszegen (*Leuciscus idus melanotus*) végzett akut teszteknel még több mint 10 mg/l-es koncentráció mellett sem volt látható hatása a kezelésnek.

3.3.9 Antineoplasztikus vegyületek a környezetben

Antineoplasztikus vegyületeket először az 1970-es években mutattak ki környezeti mintákból (Hignite és Azarnoff 1977). Az azóta eltelt évtizedek alatt sajnos a rosszindulatú daganatos megbetegedések száma nőtt, így a terápiában használt gyógyszer mennyiség is emelkedett (Yin et al. 2010, Besse et al. 2012). Manapság már nem csupán a kórházakban van mód a

kemoterápiás kezelésekre, hanem lehetőség van otthoni körülmények között is bizonyos gyógyszerek alkalmazására, illetve a kórházi kezelések egy jelentős része is ambulánsan történik. Ezáltal a daganatok kezelésében használt szerek megjelentek a kommunális szennyvizekben is. Az így kijutó vegyületeket pseudo-perzisztens anyagokként kell kezelni (Hernando et al. 2006), habár néhány ilyen vegyület poláros és így a vizekben könnyen terjed, valamint akad köztük perzisztens molekula is (Kosjek és Heath 2011). Számos molekula nem szelektív alkiláló hatású és akut, vagy krónikus kitétség mellett igazolt mutagén, karcinogén vagy teratogén hatása is van (Daughton és Ternes 1999). Az oxazafoszforin vegyületeket, ifosfamid és a ciklofoszfamid, kórházi elfolyóvizekben mikrogrammos mennyiségben történt kimutatását követően, fontos kérdéssé vált, hogy ezek a bakteriális lebontásnak ellenálló molekulák milyen mértékben bomlanak le a szennyvízkezelés során és milyen mennyiségben juthatnak ki a környezetbe (Steger-Hartmann et al. 1997). Steger-Hartmann et al. (1997) kórházi eredetű tisztítatlan szennyvíz esetében 143 ng/l-es koncentrációig tudták kimutatni a ciklofoszamidot, míg a tisztított szennyvízben a mennyisége 17 ng/l volt. Hasonló eredményeket kaptak Kümmerer et al. (1997) az ifosfamid vizsgálatokor. A kórházi szennyvizekben a vegyület becsült mennyisége 1,91 µg/l volt, míg a szennyvíztisztítóba befolyó és kifolyó víz szinte azonos, átlagosan 43 ng/l-es koncentrációban tartalmazta a vegyületet. Eredményeik alapján látható volt, hogy az ifosfamid esetében gyakorlatilag nem működnek a szennyvíztisztítási eljárások. A mellrák kezelésére használt antiösztrogén hatású tamoxifent szennyvíztelep elfolyó vizében 146 és 369 ng/l koncentráció tartományok között mutatták ki az Egyesült Királyságban (Roberts és Thomas 2006). Roberts és Thomas (2006) vizsgálatai alapján a tamoxifen koncentrációja szinte alig változott a szennyvíztisztítás során, így a kifolyók betorkollásánál 27 és 212 ng/l között mutatták ki a vegyületet. A citotoxikus hatású bleomicin vizsgálatokor (Aherne et al. 1990) 17 ng/l koncentrációig tudták a vegyületet kimutatni több angliai folyóból. Ugyancsak tisztított szennyvizet befogadó svájci folyók vízmintáinak elemzésekor a capacetabin koncentrációja 0,15–0,17 ng/l között változott (Buerge et al. 2006), míg ugyanez a vegyület 2-10 ng/l koncentrációban volt kimutatható a Lambro folyóban (Zuccato et al. 2000).

Az ifosfamid és a capacetabin esetében Buerge et al. (2006) nem találtak különbséget a svájci szennyvíztelepekre befolyó és kifolyó vizekben kimutatható koncentrációk között. Ezt a kismértékű eliminációt több tényező is magyarázhatja: (a) számos antineoplasztikus vegyület hidrofób, így csak kismértékben tud oldódni a szennyvízben; (b) több vegyület is tartalmaz halogén csoportot, amely nagyban csökkenti a biodegradációs potenciálját és (c) a legtöbb ilyen vegyület toxikus a baktériumokra (Buerge et al. 2006). Így ezek az igen erős biológiai aktivitással rendelkező vegyületek kijutva a környezetbe kockázatot jelentenek az ott élő szervezetek számára (Kümmerer et al. 2000, Lenz et al. 2007). Emellett pedig azt sem szabad

elfelejteni, hogy ezek a vegyületek mindig keverékek formájában, más vegyületekkel együtt vannak jelen a szennyvizekben, így még nagyobb környezeti kockázatot jelenthetnek.

Ezen vegyületek növekvő felhasználása mellett mind fontosabbá vált, hogy megismerjük az ökotoxikológiai kockázatokat is. Habár nagyon sokat tudunk az antineoplasztikus vegyületek pontos hatásmechanizmusairól és mellékhatásiról, a környezetben való előfordulásukról és hatásukról még kevés információ áll rendelkezésre. Mindeközéig elsősorban akut kitétség mellett és milligrammos tartományban (ppm) vizsgálták ezen szereket, amely jóval magasabb, mint az a nanogrammos koncentráció tartomány, amely a környezetben előfordulhat (Fent et al. 2006).

3.4 *Antineoplasztikus szerek*

Az úgynevezett antineoplasztikus hatású vegyületeket, más néven tumorellenes gyógyszereket, a daganatos betegségek kezelése során alkalmazzák. Meggátolják a daganatos sejtek folyamatos osztódását – a sejtproliferációt fenntartó molekuláris tényezőket károsítják – és gyors sejthalált idéznek elő. Az ilyen vegyületek több nem specifikus mechanizmus által fejtik ki hatásukat, pl. a sejt külső és belső membránrendszerének roncsolása, anoxia, és az oxidatív foszforiláció gátlása (Kiss 1997). A citosztatikus anyagok ezzel szemben a tumorprogresszióban szerepet játszó molekuláris folyamatokat képesek károsítani (Jeney és Kralovánszky 2007), gátolják, vagy elnyomják a rákos sejtek növekedését és osztódását fenntartó molekuláris folyamatokat (Besse et al. 2012). A citotoxikus szerek sejtproliferációra közvetlenül ható gyógyszerek, ezért szelektivitásuk korlátozott, ami a sikeres terápia feltétele. A citosztatikumok szelektivitása ezzel szemben jelentősebb, ha a támadási pontjukat jelentő molekuláris folyamat intenzívebb a tumorsejtekben, mint az egészséges sejtekben (Jeney és Kralovánszky 2007).

Több citosztatikum is citotoxikus. Mivel ezen vegyületek által gátolt folyamatok kifejezettebbek az osztódó, mint a nyugvó sejtekben, így az állandóan osztódó daganatos sejteket nagyobb arányban pusztítják el (Mahnik et al. 2004).

A citotoxikus gyógyszerek hatásmechanizmusuk alapján osztályozhatók:

- Alkilező szerek (ATC csoport L01A): nem specifikus kemoterápiás gyógyszerek, melyek képesek megállítani a tumor növekedését. Egy alkil csoport kovalens keresztkötésekkel kapcsolódik a DNS kettős spirálhoz, így gátolva a DNS replikációt és a sejtosztódást. Az ilyen hatásmechanizmusú vegyületek közé tartoznak a platina vegyületek is, melyek hasonló elven működnek, bár ezek nem alkil csoporttal kapcsolódnak DNS-hez. Mivel közvetlenül kötődnek a DNS-hez, így mutagén és teratogén hatással is rendelkeznek. Alcsoportok: nitrogén-mustár vegyületek (például: ciklofoszfamid), alkilszulfonátok (pl. treoszulfán), etilén iminek (pl.: thiotepa), nitrozo-karbamidok (pl. karmusztiin), epoxidok

(pl. etoglucid) platinavegyületek (pl. ciszplatin), és egyéb nem specifikusan besorolható vegyületek (pl.: dakarbazin).

- Antimetabolitok (ATC csoport L01B): Az antimetabolikus hatású daganatellenes szerek (pl. 5-fluorouracil, metotrexát) a sejttanyagcsere folyamatokba avatkoznak bele és így közvetetten gátolják a DNS replikációt, vagy nukleotid analóggként beépülnek a DNS-be és így végül apoptózist indukálnak.
- Topoizomerázgátlók: A topoizomeráz gátlók (pl. topocetan) gátolják a topoizomeráz I vagy II enzimeket, ezzel megakadályozzák a DNS kitekeredését, így gátolva a replikációt.
- Növényi alkaloidok: A madagaszkári rózsameténg (*Catharanthus roseus*) másodlagos anyagcsere melléktermék vegyületei a vinblastin és a vincristin gátolni tudják a mitotikus magorsó kialakulását, ezzel megakadályozva a sejtek szétválását. A tiszafa (*Taxus baccata*) alkaloid vegyülete a docetaxel, pedig gátolni képes a magorsó fonalak felszívódását és akadályozza a sejtosztódást.
- Citotoxikus antibiotikumok és rokon vegyületek: (pl. antraciklin antibiotikumok: mint a doxorubicin, epirubicin). Ezen vegyületek pontos hatásmechanizmusai nem teljesen tisztázottak. A DNS kettős szála közé ékelődnek be, ezzel megzavarva az RNS szintézist, így gátolva a DNS replikációt.
- Egyéb daganatellenes szerek még a platina származékok, proteinkináz inhibitorok, metilhidrazinok, monoklonális antitestek.
- EDC vegyületek (pl.: ösztrogének, androgének és antiandrogének), amelyek bár nem tekinthetők kifejezetten daganatellenes szereknek, nagy dózisban adva a betegeknek (hormonfüggő daganat esetén) megakadályozhatják a tumor növekedést (Kümmerer et al. 2016).

Az antineoplasztikus vegyületek toxicitása jól ismert emlős modelleken, azonban nagyon kevés ismeret áll rendelkezésre ezen vegyületeknek, vagy metabolitjaiknak a vízi élőlényekre gyakorolt hatásáról (Besse et al. 2012, Zhang et al. 2013, Booker et al. 2014). Kivételt ez alól csak néhány, már régóta a piacon lévő vegyület jelent, mint az 5-FU és a metotrexát (Brain et al. 2004, Kümmerer et al. 2016).

A legtöbb antineoplasztikus vegyület víz-olajban oldhatósági koefficiense -1 és 3 között található (Rowney et al. 2009). Mivel ezen gyógyszerek többségét kis dózisban alkalmazzák, így a becsült környezeti koncentrációjuk (PEC) 10 ng/l alatt van (Kümmerer et al. 2016). Ez az alacsony PEC érték az oka, hogy ezek a vegyületek a kockázatbecslések során alacsony

kockázatúnak, vagy veszélytelennek minősülnek, illetve ehhez adódik még, hogy a legtöbb anyag kockázatbecsléseknél használt akut toxicitása alacsony a vízi szervezetek esetében.

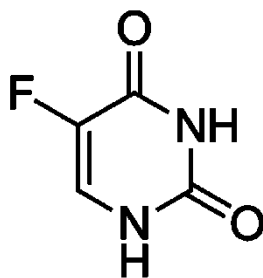
3.4.1 Az 5-fluorouracil

5-fluoropirimidin-2,4(1H3H) dion-t kemoterápiás kezelésekhez fejlesztették ki az 1950-es években és Heidelberg, valamint munkatársai fedezték fel az 5-FU enzimgátló szerepét (Chu 2007). A kiindulási vegyület metabolizációját a dihidropirimidin-dehidrogenáz enzim végzi. Az 5-FU katabolizáció nagy része a májban történik (Longley et al. 2003). Az 5-FU biológiai hatását három aktív metabolitján keresztül fejt ki.

- FdUMP (5-fluoro-2'-deoxiuridine-5'-monofoszfát), amely által indukált a timidilát szintetáz gátlása.
- FUTP (5-fluorouridin-5'-trifoszfát), amelyen keresztül beépül az RNS-be.
- FdUTP (5fluoro-'2-deoxiuridin-trifosztát), amelyen keresztül beépül a DNS-be.

Az 5-FU szerkezete a pirimidinhez hasonló, azzal analóg molekula (1. ábra). Mivel az 5-FU szerkezetében csak egy fluor csoportban tér el az uraciltól, ezért sejtosztódás során metabolitjai képesek azt helyettesíteni a nukleinsavak szintézisekor. Az uracil helyébe lépett 5-FU molekula zavart okoz a DNS replikációjában, így a daganatos sejtek nem képesek tovább osztódni. Az 5-FU hatására DNS töredezettség is megfigyelhető az osztódó sejtekben (Longley et al. 2003).

RNS esetében az FUTP metabolit nagymértékben épül be az RNS-be, úgy, hogy a riboszómális RNS képződés során a pre-rRNS fázisában kötődik az uracil helyére, megakadályozva ezzel a végleges rRNS molekula kialakítását. (Longley et al. 2003)



1. ábra Az 5-fluorouracil szerkezeti képlete

(forrás: <http://www.mpbio.com/product.php?pid=02101722&country=97>)

Az 5-FU a legnagyobb mennyiségben felhasznált antineoplasztikus gyógyszerhatóanyagok egyike (Besse et al. 2012) és így a legintenzívebben kutatott is. A IMS Health Inc. 2007-es adatai alapján évente mintegy 1240,34 kg 5-FU választódik ki és további 1450 kg kerül a szennyvizekbe Európában (Straub 2010a). Habár ennél jóval kisebb mennyiségben mérték csak

vissza a vizekből, nem jelenti azt, hogy nem jutott ki ekkora mennyiségben a vegyület a természetbe.

A vegyület becsült koncentrációja kórházi szennyvizek esetében 0,08 és 500 µg/l között, kommunális szennyvizek esetében 23 ng/l alatt, míg Németországi felszíni vizek esetében 1 ng/l-ben határozták meg (Straub 2010a). Tényleges mérési adat jóval kevesebb áll rendelkezésre, de ezek alapján úgy tűnik, a becsült értékek valóban jól közelíthetnek a valósághoz. Kosjek és Heath (2011) és Lin et al. (2014) mérései alapján környezeti mintákban az 5-FU koncentrációja 5 és 150 ng/l között változott. Kommunális tisztító telepek befolyó vizében 4,7 és 35 ng/l között változott a vegyület koncentrációja (Kosjek et al. 2013), míg egy tajvani vizsgálatban a sűrűn lakott települések kórházi szennyvizében a medián koncentráció 120 ng/l, folyók vízmintáiban pedig 6,4 ng/l volt (Lin et al. 2014).

Az 5-FU nem túl gyorsan (2 héten belül) bomlik le a felszíni vizekben és a szennyvizekben (Straub 2010a). Negreira et al. (2013a) vizsgálati alapján 25 °C-on vizes oldatban az 5-FU kevesebb, mint 20%-a bomlott le 24 óra alatt. Egy másik vizsgálatban szennyvíz mintákban ugyan ezen hőmérsékleten stabilnak bizonyult a vegyület (Negreira et al. 2014). Ez alapján feltételezhető, mivel a vegyület viszonylag stabil szobahőmérsékleten, hogy az akut laboratóriumi vizsgálatok során a nominális koncentráció nem csökken jelentősen a teszt ideje alatt.

Az 5-FU akut toxicitás vizsgálatát számos fajon elvégezték; baktérium esetében *Pseudomonas putida*, *Photobacterium phosphoreum*, *Vibrio fischeri* és *Aspergillus nidulans* fajon állnak rendelkezésre adatok (Beccari et al. 1967, Kaiser és Palabrica 1991, Bantle et al. 1994, Backhaus et al. 2000). Algák esetében *Scenedesmus* és *Raphidocelis subcapitata* fajokon (Cleuvers 2002, Zounkova et al. 2007), míg gerinctelen szervezetek közül nagy vízibolhán (Cleuvers 2002, Zounkova et al. 2007), *Ceriodaphnia dubia*-n, *Brachionus calyciflorus* és *Thamnocephalus platyurus* (Parrella et al. 2014b) igazolták az 5-FU alacsony (mg/l tartományban lévő) toxicitása. Egyedüli kivétel *A. flos* kékalgafaj volt, melynél a rövid generációs intervallum miatt a vegyület hatása jobban érvényesült és így igen toxikusnak bizonyult rövid kitettség mellett is (Cleuvers 2002). Afrikai karmosbékán (*Xenopus laevis*) végzett tesztek esetében az 5-FU toxikusnak bizonyult az embriókra és a lárvákra is (Dawson és Bantle 1987, Bantle et al. 1994, DeYoung et al. 1996). A szivárványos pisztráng (*Oncorhynchus mykiss*) és a tüzceselle akut kezelése során is az 5-FU nem bizonyult toxikusnak, az LC₅₀ érték több száz mg/l volt, a LOEC érték a torzulások tekintetében pedig 50 és 400 mg/l volt a két fajnál (DeYoung et al. 1996, Straub 2010a).

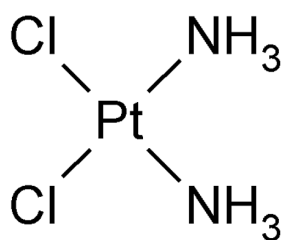
A genotoxikus hatás vizsgálata során a nem célszervezetek tekintetében *Salmonella typhimurium*, *Salmonella choleraesuis* subsp., *Escherichia coli* és *Saccharomyces cerevisiae* végeztek vizsgálatokat (Hartmann et al. 1998, Zounkova et al. 2007). Valódi genotoxikus hatást

csak a *S. typhimurinum* és az *E. coli* esetében (mg/l-es koncentráció tartományban), valamint a *S. cerevisiae* fajon figyeltek meg ($\mu\text{g/l}$ -es koncentráció tartományban). *Unio pictorum* és *Unio tumidus* kagylófajok vizsgálata során nem figyeltek meg genotoxikus hatást, azonban a hemociták csökkent sejtosztódása volt tapasztalható (Gacic et al. 2014).

A vegyület krónikus toxicitásának tesztelése során *A. flos-aquae* cianobaktérium fajon növekedés gátlást mutattak ki. Vizsgálták az 5-FU szaporodásbiológiai hatását nagy vízibolhán, illetve hosszútávú kezelést alkalmaztak *B. calyciflorus* és *T. platyurus* rotatória fajokon (Parrella et al. 2014b). E mellett korai életszakasz teszt során zebraadánió is megfigyelték a vegyület növekedésre gyakorolt hatást (Egeler és Seck 2009, Straub 2010a). Vízibolhán a krónikus kitettség $\mu\text{g/l}$ -es tartományban 50%-al csökkentette az utódok számát, míg a kerekeshéreg fajokon nem volt megfigyelhető hasonló hatás. A zebraadánió esetében csak 32 mg/l-t meghaladó tartományban volt megfigyelhető hatása a kezelésnek. Az eredmények alapján az 5-FU-nak nincs jelentős környezeti kockázata abban az esetben sem, ha 50 $\mu\text{g/l}$ -es koncentrációval számolunk a szennyvizek és 5 $\mu\text{g/l}$ -el a felszíni vizek esetében (Straub 2010a). Azt azonban meg kell jegyezni, hogy a vízibolhák végzett reprodukciós tesztben mért 4,6 $\mu\text{g/l}$ EC_{10} érték megközelíti ezt a koncentráció tartományt (Parrella et al. 2014b). Ezen eredmények alapján látható, hogy a hatásos koncentrációk a mért és becsült környezeti koncentrációk többszörösei.

3.4.2 A cisplatin

A platina tartalmú cisplatin (2. ábra) bár már 25 éve használják a rákos megbetegedések kezelésben, pontos molekuláris hatásmechanizmusa még mindig nem tisztázott (Barna 2005). Magát a vegyületet, mint terápiás szert 1969-ben fedezték fel (Rosenberg et al. 1969). Ismert, hogy a DNS-hez kötődik és interkaláló ágensként keresztkötetést alakít ki a kettős spirálban, ami a transzkripció és a DNS replikáció során DNS-töréseket okoz (Reed 1998). A DNS-sérülés hatására sok szignáltranszdukciós molekula aktiválódik (pl. p53, p78). Ha a törések nem javítódnak ki, akkor sejthalált indukáló jelek indulhatnak el. Kimutatták, hogy a sejt állapotától, illetve a szer koncentrációjától függően apoptózis vagy nekrosis következik be (Shibuya et al. 2003). Az apoptózis során a mitokondrium depolarizációját és a kaszpázok aktivációját figyelték meg (Mayer et al. 2003). A cisplatin ototoxikus és károsítja a vese nefronjait is (Reddel et al. 1982), e mellett pedig megfigyelték, hogy zebraadánió embriók oldalvonal szervében károsodnak az érzékelő szőrök a cisplatin kezelés következtében (Ou et al. 2007), mely hatás nagy hasonlóságot mutatott az emlős vizsgálatoknál tapasztalt halló szőrök károsodásához.



2. ábra: A cisplatin szerkezeti képlete

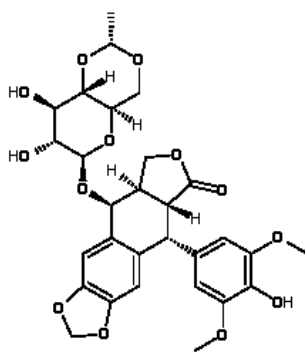
(forrás: http://www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0_m17910.html)

A cisplatin környezeti mintában történő mérésére vonatkozóan nagyon kevés adat áll rendelkezésre. Kümmerer és Helmers (1997) kórházi szennyvizekben összes platina tartalom tekintetében 110–176 ng/l mutattak ki (nappal) és körülbelül 38 ng/l (éjjel), ami jól mutatja az egyes napszakok közti kibocsátás különbségeit. A cisplatin, hasonlóan az 5-FU-hoz meglehetősen stabil vegyület. 25 °C-on vizsgálva 24 óra alatt csak kb. a 20%-a bomlott le a vegyületeknek (Negreira et al. 2013a) és szennyvízben is igen stabilnak bizonyult (Negreira et al. 2014). A 2004-2008-as Franciaországban felhasznált cisplatin mennyiség alapján becsült környezeti koncentráció 0,4 és 0,5 ng/l (Besse et al. 2012) volt.

Brezovsek et al. (2014) akut toxicitás vizsgálatokban *P. subcapitata* esetében 1,52 mg/l-ben határozta meg az EC₅₀ és 0,98 mg/l-ben a LOEC értéket. Valamivel alacsonyabb értékeket kaptak *S. lepopliensis* fajon végzett vizsgálatok során, mely eredményei alapján az EC₅₀ 0,67 mg/l, míg a LOEC 0,31 mg/l volt. A vízibolhák (*D. magna*, *C. dubia*) és kerekeshérgen (*B. calyciflorus*, *T. platyurus*) végzett akut tesztek is mg/l-es koncentrációtartományban okoztak jelentősebb elhullást az állatokon, míg krónikus kitétség esetén már µg/l-es tartományban is igazolhatóan csökkentette a vízibolhák szaporodását (Parrella et al. 2014b).

3.4.3 Az etoposide

Az etoposide a topoizomerázgátlók közé tartozó vegyület (3. ábra). A topoizomerázok közreműködnek a DNS replikációjában, a gének átírásában és szegregációjában. A topoizomeráz enzimeknek biológiai hatásuk alapján két elérhető formájuk ismert, a topoizomeráz I és II. Ezen enzimeknek a sejtbiológiai szerepük annyiban különbözik, hogy a topoizomeráz I a DNS károsodás helyreállító folyamataiban, a topoizomeráz II a sejt életképességének fenntartásában van szerepe (Jeney és Kralovánszky 2007). Az etoposide a podofillotoxinok közé tartozik, melyek a topoizomeráz II működését gátolják (3. ábra). A gátlás több szinten mehet végbe, részben a DNS topoizomeráz komplex stabilizálásával, részben az enzimnek a DNS-hez történő kötődése előtti gátlásával képesek a daganatok növekedését korlátozni (Jeney és Kralovánszky 2007).



3. ábra Az etoposide szerkezeti képlete

(forrás: <https://en.wikipedia.org/wiki/Etoposide#/media/File:Etoposide.svg>)

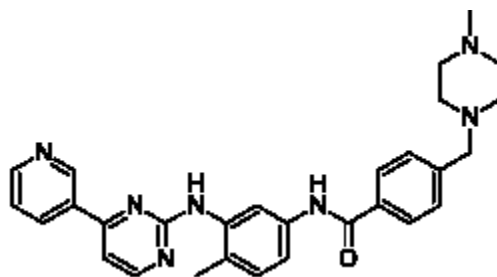
Az enzim működésének hiánya hibákat eredményez a DNS szintézis során, amely végül a DNS károsodásához és sejthalálhoz vezet (Pommier 2013).

Az etoposide környezetben való jelenlétéről, hasonlóan a másik három vegyülethez, kevés adat áll rendelkezésre. Yin et al. (2009) pekingi kórházak elfolyóvizében 6-380 ng/l koncentráció tartományban tudták kimutatni. A vegyület bomlása 25 °C-on 20%-nál kisebb mértékű volt vizes oldatban, azonban ugyanilyen hőmérsékleten szennyvízben már sokkal nagyobb mértékben degradálódott (Negreira et al. 2013a, Negreira et al. 2014). A 2004-2008-as franciaországi fogyasztási adatok alapján a becsült környezeti koncentráció 7-ről 0,8 ng/l-re csökkent (Besse et al. 2012). Az északnyugat-angliai adatok alapján pedig az elfolyóvizekben az etoposide PEC értéke 1,3 ng/l, míg felszíni vizekben jóval alacsonyabb 0,1 ng/l (Booker et al. 2014) volt.

P. subcapitata-n végzett akut vizsgálat alapján Brezovsek et al. (2014) az EC₅₀ érték 30,43 mg/l, míg a LOEC 34,46 mg/l volt. Parrella et al. (2014b) vizsgálataiban egyik gerinctelen (*D. magna*, *C. dubia*, *B. calyciflorus*, *T. platyurus*) modellállat esetében sem bizonyult toxikusnak az etoposide.

3.4.4 Az imatinib mesylate

A kutatók egyre nagyobb tudással rendelkeznek a jelátviteli útvonalakról mind az egészséges, mind a neoplasztikus sejtekben, ezáltal újabb és újabb stratégiák születnek a daganatos megbetegedések gyógyításában. Az imatinib az úgynevezett protein-tirozinkináz inhibitor csoporthoz tartozó citosztatikum és az első terápiában is alkalmazott ilyen vegyület (4. ábra).



4. ábra: Az imatinib mesylate szerkezeti képlete

(forrás: <https://en.wikipedia.org/wiki/Imatinib#/media/File:Imatinib2DACS.svg>)

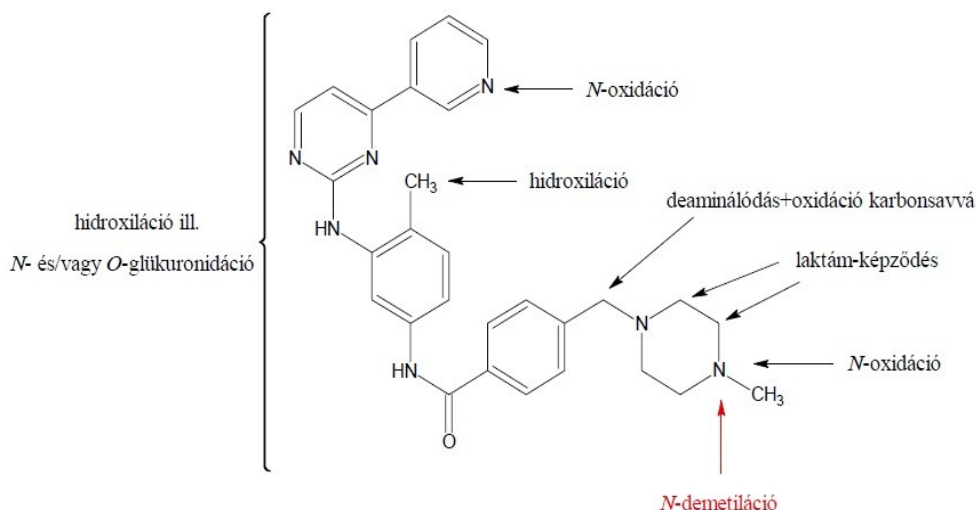
Az 1980-as évek közepén megindult a *Bcr-Abl* tirozin-kináz specifikus gátlószerének kifejlesztése a mieloid leukémia terápiás kezelésére. Az első hatásos vegyületcsaládot a svájci Ciba-Geigy gyógyszergyár (ma Novartis) kutatói közölték, akik 10 nM-os IC_{50} -es értéket találtak a vérlemezke-eredetű növekedési faktor receptor tirozin-kináz autofoszforylációját gátló fenilamino-pirimidinek körében (Béni 2007).

A fenilamino-pirimidin struktúra ezek után vezérmolekulaként szolgált minden további szelektív, az ATP kötőhelyen ható tirozin-kináz gátló vegyület kifejlesztéséhez. Az imatinib is a fenilamino-pirimidin vezérmolekula kémiai módosításai után nyerte el szerkezetét (Zimmermann et al. 1997).

Az imatinib az inaktív konformációban kötődik az *Abl* tirozin-kinázhoz. A vegyület piridin- és pirimidin gyűrűje elfoglalja az ATP adeninjének kötőhelyét, míg a molekula többi része mélyen beékelődik a szerkezet hidrofób régiójába (Béni 2007).

A felszívódást követően, klinikailag releváns koncentrációviszonyok között az imatinib 95%-a plazmafehérjékhez kötődik, főként albuminhoz és α 1-savas glikoproteinhez (Baker 2002).

Metabolizmusa a májban történik döntően a CYP3A4 és a CYP3A5 izoenzimek segítségével. Metabolikus átalakulásának lehetséges útvonalai az 5. ábrán láthatók. Fő metabolitja a 5. ábrán jelölt *N*-demetil-imatinib, amely *in vitro* és *in vivo* egyaránt hatásos vegyület, aktív metabolit 40 órás eliminációs féleletidővel (Nikolova et al. 2004) rendelkezik.



5. ábra Az imatinib fő metabolitja ábrán pirossal jelölt N-demetiláció eredményeként képződő N-demetilimatinib (forrás:(Béni 2007))

Az imatinib metabolitjai formájában ürül ki a szervezetből, túlnyomó részt a széklettel, és csekély mértékben a vizelettel. A székletben azonos mennyiségben mutatható ki az imatinib fő metabolitja, és további egyharmad részben a különböző oxidált származékok. Az eliminációban fontos szerepe van az enterohepatikus körforgásnak is, ugyanis a vizeletben és a plazmában egyaránt kimutatható glükuronidok a székletből nem mutathatók ki, amit a vékonybélben lejátszódó mikrobiális dekonjugációnak tudnak be (Ramalingam et al. 2004).

Az imatinib esetében is igen hiányosak az ismereteink a környezetben való viselkedéséről. A vegyülete 25 °C-on vizes oldatban 50-80%-ban bomlott le, hasonló stabilitást tapasztaltak szennyvízminták esetében is (Negreira et al. 2013a, Negreira et al. 2014). A 2004-2008 közötti franciaországi humán felhasználás adatai alapján a környezeti koncentrációt 13 és 21 ng/l közöttire becsülték (Besse et al. 2012). Nem célszervezetek esetében a Brezovsek et al. (2014) által *P. subcapitata* fajon végzett tesztben 2,29 mg/l volt a EC₅₀ és 1,19 mg/l a LOEC érték. A *S. lepopliensis*-sel végzett tesztben pedig ugyanezek az értékek 5,36 és 4 mg/l voltak. A vegyület esetében végeztek vizsgálatokat vízi bolha fajokon (*D. magna*, *C. dubia*) és kerekesszerveken (*B. calyciflorus*, *T. platyurus*), valamint tűzcselle halfajon is (CHMP 2013, Parrella et al. 2014b). Mind a vízi gerincteleneken, mind a halakon végzett vizsgálatok alapján az imatinib toxicitása alacsony volt akut és krónikus kitettség esetén is. Magasabb rendű növényeken (*Tradescantia sp.*, *Allium cepa*, *Chelidonium majus*, *Tradescantia palludosa*, *Arabidopsis thaliana*) végzett teszteknel hatásos koncentrációi több mint ötszörös értéket mutattak, mint a becsült környezeti koncentrációk (Pichler et al. 2014)

3.5 Keverékek a környezetben

A hatóanyagok többsége keverékek formájában van jelen a környezetben. Ritkán fordul elő, hogy csak 1-1 hatóanyagot lehet kimutatni egy környezeti mintából. A keverékekben megjelenő szennyezők hatásáról pedig még kevesebb ismerettel rendelkezünk, mint az egyes önálló xenobiotikumokról (Cleuvers 2004, Parrella et al. 2014a).

A klasszikus toxikológiában több toxikus anyag együttes hatásainak osztályozására az alábbi főbb csoportokat különböztethetjük meg:

- Additivitás: A és B vegyület hatása egyforma mértékű. Együttes hatásuk összeadódik.
- Szinergizmus: A és B vegyület együttes alkalmazásának hatása nagyobb, mint ahogy a kettőé együttesen várható lenne.
- Antagonizmus: Az A és B vegyület együttes hatásának összegződése (additív hatás) kisebb, mint azok külön érvényesülő hatásának számtani összege, azaz egymás hatását gyengítik. *Funkcionális antagonizmus*: két vegyület ellenkező hatást vált ki. *Kompetitív antagonizmus*: a hasonló szerkezetű, de ellentétes hatású vegyületek, mérgező anyagok vetélkedése jellemző a kötődési helyért. *Nem kompetitív antagonizmus*: ha egy molekula hatását, egy másik anyag blokkolja, de nem ugyanazon receptorokra történő hatással.
- Potenciáció: A vegyület önmagában nem lenne toxikus, de B vegyülettel együtt annak hatását erősíti. (Zeliger 2008)

A különböző vegyületek keverékeinek ökotoxikológiai hatásait vizsgálva a kutatók már 30 éve keresik a választ, hogyan tudnák minél pontosabban megbecsülni a lehetséges hatást (Altenburger et al. 2000, Backhaus et al. 2000, Faust et al. 2001). Két koncepció terjedt el a keverékek toxicitásának becslésére, ezek a koncentráció összeadódás (CA) és a független hatás (IA) (Cleuvers 2003).

A koncentráció összeadódás módszerének alapjait két gyógyszerész, Loewe és Muischnek fektette le (Loewe és Muischnek 1926, Loewe 1953). A módszer egy fontos pontja, hogy az egyes vegyületek NOEC koncentrációja már nem adódhat hozzá a keverék hatásához. Maga a módszer hasonló hatásmechanizmusú vegyületek együttes hatásának becsléséhez lett kidolgozva, még ha a hasonló hatásmechanizmus fogalmát sokan különbözően értelmezik is. A funkcionális megközelítés alapján a hasonló hatásmechanizmus alatt tulajdonképpen a célmolekula szintjén megfigyelhető ugyanazon interakciót kell érteni (Cleuvers 2003). Ezzel szemben hasonló hatásként sokan a vizsgált organizmus szintjén megnyilvánuló toxikus hatást veszik figyelembe, például a pusztulást.

A CA módszer alkalmas inert vegyületek keverékeinek toxicitás becslésére is. Inert alatt olyan vegyületek értendők melyek nem rendelkeznek speciális receptoron keresztül megnyilvánuló

hatással és nem lehet specifikus akut hatással jellemezni (Broderius et al. 1995, Van Loon et al. 1997). Az inert vegyületek általános, szisztémás hatását nevezik narkózisnak. Tágabb értelemben a narkózis olyan depresszív hatás, amely nemcsak az idegsejten, hanem minden élő sejten kiváltható (Van Leeuwen et al. 1992, Verhaar et al. 1992). Amennyiben egy vegyületnek nincs specifikus mérgező hatása, úgy a toxikus hatásának mértékét, bizonyos határok között, a log K_{ow} értékkel lehet jellemezni (Cleuvers 2003). A narkózis típusú hatást szokás alap toxicitásnak is nevezni (Verhaar et al. 1992).

Egy másik alternatív koncepció a független hatás módszere, melyet Bliss (1939) dolgozott ki. A módszer alapját az adta, hogy számos keverékben megtalálható vegyület különböző célmolekulán keresztül fejti ki hatását. Ennek alapján, ha a keverékben szereplő vegyületek hatásmechanizmusa különböző, akkor a hatások változatlanul, külön-külön fognak megnyilvánulni egymás mellett. Tehát, ha egy vegyület a keverékben a NOEC értéke alatt szerepel, úgy a hatása sem fog megjelenni a keverék teljes hatásában. Ez alapján ha minden vegyület a NOEC értéke alatti koncentrációban van jelen, úgy toxikus hatás egyáltalán nem fog megnyilvánulni (Cleuvers 2003).

Természetesen sok esetben, ha egy vegyület meghatározott koncentrációval szerepel a keverékben, akkor a kombinált toxicitás erősebb lesz, mint ha csak a koncentráció összeadódás módszerét vennénk alapul. Ezt a különálló koncepciót gyakran, tévesen összefüggésbe hozzák a szinergizmussal és az antagonizmussal. A szinergizmus és az antagonizmus azonban a vegyületek között attól függetlenül is megnyilvánulhat, hogy a hatásukat hasonló vagy különböző módon fejtik ki (Cleuvers 2003).

A keverékek hatásának becslési módszere mellett, másik fontos kérdés a toxicitási kísérletek során tesztelt valódi keverék koncentrációinak helyes kiválasztása. Az irodalomban fellelhető lehetőségek alapján a koncentrációk kiválasztására két módszer terjedt el. Mindkét módszerhez szükséges az egyes vegyületek dózis-hatás összefüggésnek ismerete. Az EC vagy LC értékek ismerete alapján készíthetők el a különböző tesztelendő keverékek.

Kundi et al. (2015) két vízibolha faj esetében vizsgálták antineoplasztikus vegyületek genotoxikus hatását keverékekben. A keverékek elkészítéséhez két hatás értéket választottak ki a vegyületek dózis-hatás értékei alapján, majd az egyes bináris keverékek izobogramja alapján határozták meg a tényleges tesztelendő koncentrációkat.

Egy másik módszer szerint az egyes vegyületek EC vagy LC értékeihez számított koncentrációkat választják ki. Ez legtöbbször EC_5 , EC_{10} , EC_{20} , EC_{30} , EC_{50} , EC_{80} vagy EC_{90} (Cleuvers 2003, Brian et al. 2005, Thorpe et al. 2005, Brezovsek et al. 2014). Az ezen értékekhez tartozó koncentrációértékeket bináris keverékek esetében elosztják kettővel és az így kapott koncentrációkat keverik össze.

Természetesen más rendszer szerint is el lehet készíteni a keverékeket, például ha az egyes vegyületek ugyanolyan mennyiségben vannak jelen az oldatban (Stancova et al. 2014). Ez a módszer azonban nem veszi figyelembe az eltérő hatásos koncentrációkat, illetve így nehezen megítélhető a vegyületek együttes hatása.

3.6 Ökotoxikológiai vizsgálatok gyógyszerhatóanyag keverékekkel

A keverékek vizsgálata nagyon fontos és aktuális témája az ökotoxikológiának. Számos munka foglalkozott a különböző xenobiotikum keverékek hatásának megismerésével. Ezek a vizsgálatok elsősorban a környezetben zajló folyamatokat kívánják modellezni, ezért a legtöbb ilyen vizsgálatnál a különböző eredetű vízminták kémiai és biológia elemzését egyszerre végzik el, így kapnak pontosabb képet a keverék hatásáról. Li és Lin (2015) kórházi elfolyóvizekben összesen 19 különböző gyógyszerhatóanyagot azonosított. A vízminták tesztelését nagy vízibolhán, *N. denticulate*-n és két halfajon, kínai razbórán (*Pseudorasbora parva*) és pontyon (*Cyprinus carpio*) végezték. A minták elemzésénél különös figyelmet fordítottak az oldott oxigén és ammónia tartalom vizsgálatára is, mely befolyásolhatta az eredményeket. A vizsgálat során a legérzékenyebb szervezetnek a ponty bizonyult, így a mesterséges keveréket már csak ezen a fajon tesztelték a későbbiekben. A keverék elkészítése során mind a 19 vegyület 10 mg/l-es koncentrációban szerepelt a törzsoldatban, melynek így az összes hatóanyag tartalma 190 mg/l volt. Eredményeik alapján a keverék LC₅₀ értéke 60,68 mg/l volt 96 órás expozíció mellett. Egy másik vizsgálatban acetaminofen, karbamazepin, gemfibrozil és venlafaxin hatóanyagok keverékének 0,5 és 10 µg/l-es koncentrációját hasonlították össze 5% és 25%-os hígítású tisztított szennyvízzel. A vizsgálat során 6 hétig kezelték felnőtt zebradániókat. Eredményeik alapján mind a két kezelés hatására romlottak a halak szaporodásbiológia mutatói, illetve ez egyes hatóanyagokra jellemző patológiai elváltozások is megfigyelhetők voltak. A legnagyobb koncentrációjú keveréknél szignifikánsan nagyobb volt a kezelt egyedek ivásából származó embrióinak mortalitása (Galus et al. 2013). Egy hasonló vizsgálatban Watanabe et al. (2016) a japán Tama folyóban azonosított 10 gyógyszerhatóanyaggal végzett vizsgálatokat *P. subcapitata*, *C. dubia* és zebradánió fajokon. Az alga tesztek esetében végzett CA és IA becslések jól közelítették a valós toxicitást, hasonlóan a hal embriókon végzett teszthez. A vízibolhák esetében azonban egyik módszer sem bizonyult megfelelőnek a hatás előrejelzéséhez. A keverékek tesztelésének egy másik módszere esetében, különböző kombinációkban és keverési arányokban hasonlítják össze a mesterséges keverék toxicitását az önálló hatóanyagokéval. Klofibrinsav és karmabazapin gyógyszerekkel végzett nagy vízibolha immobilizációs tesztek esetében a keverékek sokkal toxikusabbnak bizonyultak, mint amire az előzetes eredmények alapján számítottak. Külön-külön vizsgálva a két vegyület gyenge toxicitást

mutatott. Ugyanilyen eredményt kaptak az ibuprofen és a diclofenac keverékeinek vizsgálata során (Cleuvers 2002). Ennél a vizsgálatnál is igazolódott, amennyiben egy-egy gyógyszer akut toxicitása alacsony, a keverékek valós toxicitása jóval magasabb lehet, mint azt a prediktív modellek előre jelezni képesek. Az ibuprofen és a diclofenac keverékének vizsgálatakor hasonlóan nem adott közelítő eredményt sem a CA, sem az IA módszer a vízibolha immobilizációs tesztre, míg az *D. subspicatus* fajon a CA jól becsülte meg a valós toxicitás mértékét (Cleuvers 2003). Szintén ebben a vizsgálatosorozatban a klofibrin és a karbamazepin keverékének toxicitásának hatását az immobilizáció vizsgálatban a CA, míg az alga növekedésgátlást az IA módszer jelezte legjobban előre.

Hosszú expozíciós idő esetén még nehezebb a hatás becslése. Ensenbach és Nagel (1997) zebradániókon végzett teljes életciklus vizsgálatot, melyben a 3,4-dikloroanilin és a lindan hatását vizsgálták 3 keverékben. A 100 µg/l 3,4-dikloroanilint és 40 µg/l lindant tartalmazó keverék hatására a halak ivarérese teljesen elmaradt. Compón (*Tinca tinca*) végzett korai életszakasz tesztben tanulmányozták az ibuprofen, a diclofenac és a karbamazepin keverékét (Stancova et al. 2014). Az alkalmazott öt keverékben a vegyületek koncentrációja megegyezett. A 2, 20 és 60 µg/l-es keverékekben az állatok fejlődésében látható volt némi elmaradás a kontroll halakhoz képest, illetve minden csoportban szövettani elváltozások voltak láthatóak a májban, a vesében és a kopoltyún. A legnagyobb koncentráció esetében pedig igazolhatóan nőtt a mortalitás mértéke és a különböző torzulások megjelenése. A környezeti koncentrációtartományban azonban nem volt megfigyelhető semmilyen hatás (20 és 200 ng/l).

Az ösztrogén hatású vegyületek csoportja talán a legjobb példa a koncentráció addíció jelenségére, mivel ezeknek a vegyületek a legtöbbje ugyanazon az útvonalon fejti ki hatását. Thorpe et al. (2005) által angliai szennyvízminták ösztrogén hatását vizsgálva kimutatták, hogy az *in vitro* rYES teszt és a 14 napig kezelt tüzscellék vérének vitellogenin eredményei jól korreláltak egymással. Eredményeik rámutattak, hogy a szennyvizek ösztrogén hatásának megfelelő modellezéséhez szükséges az ösztrogénformák koncentrációjának ismerete is. Az ösztradiol, etinilösztradiol, nonylphenol, octylphenol és biszfenol-A keverékeinek hatását Brian et al. (2005) tanulmányozták tüzscellén. A halak vér vitellogenin tartalmának változása nagyban hasonlított a CA módszer segítségével becsült értékekre. Ezek az eredmények pedig rámutatnak arra, hogy az ösztrogén hatású vegyületek még nagyobb környezeti kockázatot jelentenek a hatásuk összeadódása miatt.

Antineoplasztikus vegyületek keverékeinek (5-fluorouracil, cisplatin, etoposide, imatinib) *Pseudokirchneriella subcapitata* és *Synechococcus leopoliensis* fajokon történő vizsgálata során az 5-FU+CisP és az 5-FU+IM keverékek esetében a hatás szinergisztikus volt, míg a CisP+ET keverékénél a hatás antagonisztikus volt (Brezovsek et al. 2014). A vizsgálatok során egyik

modell sem tudta megfelelően előre jelezni az algák növekedésgátlását a keverékekben. Ugyanezen vegyületek genotoxikus hatását vizsgálták *D. magna* és *C. dubia* modellen (Kundi et al. 2015). Az eredmények alapján a legtöbb keverékben a hatás antagonisztikus volt a becsült értékekhez képest, egyedül a CisP+IM keverékének genotoxicitása volt az IM módszerrel előrejelezhető. Ezen kutatócsoport másik vizsgálatában *D. magna* és *C. dubia* fajon vizsgálták az előző két tesztben is bemutatott antineoplasztikus vegyületek toxikus hatását (Parrella et al. 2014a). A vegyületek egymástól független hatása volt igazolható mindkét fajon a legtöbb keverék esetében, kivéve az IM+ ET és IM + CisP keverékeket nagy vízibőlhán és a ET+CisP és ET+5-FU keverékeket *C. dubia* fajon. Ezeknél a kombinációknál a hatás antagonisztikus volt. A fenti eredményekből látható, hogy ugyanazon keverékek az eltérő tesztszervezeteken, vagy a különböző toxikológia végpontok vizsgálatokor egészen másként viselkednek keverékek formájában.

3.7 Halmodellek a toxikológiában

A toxikológiai vizsgálatok fontos elemét képezik minden vegyület, legyen az gyógyszer, növényvédőszer, vagy ételadalék engedélyezésének. Az Európai Unió megfelelő szervei, valamint az Egyesült Államokban az EPA és az NIH nagy figyelmet fordít, hogy a területén gyártott, vagy behozott vegyületek egészségügyi és környezeti kockázatait megismerjék. Az EU által meghatározott REACH irányelvek alapján 2018-tól minden 1-100 t/év mennyiségben gyártott vegyületek környezeti kockázatát meg kell vizsgálni. Az egyes anyagok kockázatának felmérése több lépcsős folyamat, melynek az *in silico* és *in vitro* vizsgálatok mellett az *in vivo* tesztek is fontos részét képezik. A halakon végzett vizsgálatok elsősorban az ökotoxikológiai kockázat felmérésének fontos elemei. Az EMA által a gyógyszerek környezeti kockázatának felmérésére a tesztelés második fázisában a halak korai életszakasz vizsgálatát írja elő. Az EPA pedig zebradánió embriókat használ a vegyületek teratogén hatásának tesztelésére (Padilla et al. 2012).

A halak használatának számos előnye van a toxikológiai vizsgálatokban, azonban az egyik legfőbb érv ezen modellek mellett a vizsgálat költségeinek csökkentése. Emellett minden olyan expozíciós forma kivitelezhető a halakon, melyeket az emlősökön is alkalmaznak (*subcutan*, *per os*, táplálékkal stb.), az inhalációs kezelést kivéve. Mivel a halak teljes testfelületükkel képesek a vízből anyagokat felvenni, ezért a vegyületek adagolásának legegyszerűbb módja a vegyületnek a halak tartóvizében való feloldása. Fontos szempont még a halak mellett, hogy a halaké a legváltozatosabb gerinces csoport, így pedig számos faj bevonására van mód a vizsgálatokba. A legelterjedtebb halmodellek között számos akváriumi díszhal található (szivárványos guppi - *Poecilia reticulata*, zebradánió, rózsás díszmárna – *Pethia conchonius*), de persze a gazdaságilag

fontos halfajok közül is többet használnak toxikológiai vizsgálatokban (ponty, pisztrángfélék - *Salmonidae*, nílusi tilápia). A kistestű laboratóriumi halak közül az Egyesült Államokban a leggyakrabban a tűzcsellét, Japánban a medakát, Európában pedig a zebradániót használják a legtöbb laborban (Ankley és Johnson 2004).

A biológiai kutatások területén ma már elvárás a vizsgálatok tervezése során a 3R (Replacement, Reduction, Refinement) elvének érvényesítése (Russell és Burch 1959), emiatt olyan alternatív tesztek és modellek felé fordultak a kutatók, melyekkel kiválthatják az állatkísérleteket. A hal és ezen belül is leginkább a zebradánió embriókat egyre elterjedtebben alkalmazzák alternatív modellként (Scholz et al. 2008). Ennek legfőbb oka az, hogy a halembriók a táplálkozás megkezdéséig, a 2010/63/EU direktíva alapján nem minősülnek állatnak, ez a zebradánió esetében a termékenyüléstől számítva 5 napot jelent (Strähle et al. 2012).

3.8 Zebradánió a toxikológiában

A zebradánió Dél-Ázsiában őshonos, a pontyfélék családjába tartozó halfaj. Elterjedési területe magában foglalja az indiai szubkontinentet, Birmát, Nepált és Pakisztánt is (Lawrence 2007, Spence et al. 2008), így a trópusi és a szub-trópusi égövön is elterjednek számító melegvízi fajról van szó. A faj az álló és a lassú folyású vizeket kedveli ezért is tartható jól akváriumi és laboratóriumi átfolyó vizes rendszerekben egyaránt. A víz minősége iránt kevésbé érzékeny, a kissé lúgos, nagyobb átlátszóságú vizeket kedveli (Lawrence 2007). A táplálkozás szempontjából egy igazán generalista fajról van szó, mely ugyanúgy fogyaszt bentikus és planktonikus élőlényeket, mint vízbe hullott szárazföldi rovarokat és lárvákat (Dutta 1993).

A zebradánió az egyik legelterjedtebb modell szervezetté vált az elmúlt 30 évben számos tudományterületen. A faj több olyan tulajdonsággal rendelkezik, mely népszerűvé tette a különböző tudományterületek számára, mint modell szervezet. A toxikológia számára a zebradánió legfontosabb tulajdonsága a kis testméret és a nagy egyedsűrűségben való tarthatóság. A teratológiai vizsgálatok szempontjából az átlátszó embrió és ikrahéj könnyen azonosíthatóvá teszi a fejlődési rendellenességeket, míg a fajra jellemző magas fekunditás a reprodukciós toxikológiai tesztek számára jelent fontos előnyöket. A rövid generációs intervallum pedig a teljes életciklus és a több generációs vizsgálatok elvégzését könnyíti és rövidíti meg (Hill et al. 2005). Emellett számos egyszerű, költséghatékony kísérleti eljárást (mikromanipulálás, génexpressziós vizsgálatok) dolgoztak ki zebradánióra, de az emlősöknél használt módszerek jelentős részét is adaptálták rá (Winn 2001). A zebradánióban található gének, receptorok, molekuláris és élettani folyamatok nagymértékű hasonlóságot mutatnak az emlősökével és így az emberével is (Müller, 2005). Habár a zebradánió és emlős összehasonlító toxikológiai vizsgálatok során alkalmazott végpontok eredményei nem mindig korrelálnak

egymással, a halembrión végzett teratológiai tanulmányok eredményei mégis jól tükrözik a rágcsáló és nyúl tesztek eredményeit (Ducharme et al. 2015). Elsősorban a biológiai útvonalakhoz (ösztrogén-vitellogenin tengely, neurotranszmitter gátlás stb.) kötött vizsgálatok azok, ahol a zebradánió embriótesztek segíthetnek csökkenteni az emlős kísérletek számát (Perkins et al. 2013).

3.9 *A zebradánió laboratóriumi tartása*

A zebradániót csak Európában több mint 360 laboratóriumban tartják kísérleti célokra (Geisler et al. 2016). Elmondhatjuk, hogy a nyugat-európai országokban nincs olyan orvosi vagy élettudománnyal foglalkozó egyetem, kutatóintézet, ahol ne működne zebradániós állatház. Azonban azt is meg kell jegyeznünk, hogy csak mostanára kezdi elérni ezen laboratóriumok működése azt a színvonalat, ami a rágcsálós állatházaknál már évtizedek óta elvárás. Mivel a zebradániós kutatók jelentős része a biológia és az orvostudomány területéről kerül ki, így a halak tartásáról és neveléséről nem rendelkeznek előzetes ismeretekkel. Olyan elismert, állatház vezetőik is mint Christian Lawrence, a harvardi Children's Hospital Boston, Karp Family Research Laboratories vezetője is hangsúlyozta, hogy a zebradánió laboroknak integrálni kellene a halgazdálkodási gyakorlatban meglévő ismereteket a takarmányozás és a lárwanevelés területén (European Zebrafish Meeting 2015 – szóbeli közlés).

3.9.1 *Vízminőség*

Bár a zebradániók jól tolerálják a vízminőség változtatását, azonban a laboroknak elsődleges fontosságú a halak tartására szolgáló vízminőség stabilitásának garantálása is, hiszen csak így érhető el a minimális stressz szint, illetve így várható el az optimális növekedés és az ivartermék előállítása.

Az egyik legfontosabb vízfizikai paraméter a hőmérséklet. Ennek szempontjából a zebradániók elég toleránsak, hiszen a természetes élőhelyükön is 1,6 és 33 °C tartományban mozog a vizek hőmérséklete. A laborok többségében 28,5°C-on tartják a halakat Westerfield (1995) útmutatása alapján, azonban egy szélesebb, 24-30°C hőmérsékleti tartomány kedvező a halak laboratóriumi tartására (Matthews et al. 2002, Lawrence 2007).

A pH tekintetében ugyancsak kevésbé érzékenyek a zebradániók a tartásuk során. Az optimális pH érték tartomány laboratóriumi körülmények közt a 7-8 között található. Fontos, hogy ez a tartomány a legmegfelelőbb a bioszűrőben élő szervezetek számára is (Masser et al. 1999). Ezek a baktériumok biztosítják a nitrogén és foszfor formák eliminációját a vízből, ami a megfelelő vízminőség elengedhetetlen feltétele.

A víz összes sótartalma szempontjából ugyancsak tágtűrésű fajról beszélhetünk. Sawant et al. (2001) vizsgálatai alapján a 0,3-14 g/L közti só koncentrációt is tolerálják a zebradániók. A halak tartási szempontjából azonban az optimális a 0,25-0,75 g/L közti tartomány (Lawrence 2007).

Az oxigén koncentrációja szempontjából nincsenek pontos adatok a zebradánió esetében, azonban mint meleg égővi halfaj, kevésbé érzékeny a víz alacsonyabb oxigén telítettségére (Lawrence 2007). A toxikológiai tesztek során is a 60%-os ASV szerepel az OECD protokollokban (OECD 1992a, OECD 1992b, OECD 2013b) minimális mennyiségként.

3.9.2 Takarmányozás

A zebradánió, mint laborállat tartástechnológiájában talán a legnagyobb elmaradás a rágcsálókhoz képest a takarmányozás szempontjából figyelhető meg (Watts et al. 2012), ugyanakkor ez az a tényező, amely leginkább meghatározza a vizsgálatokhoz felhasznált állatok kondícióját és a lerakott ikra mennyiségét.

A zebradánió számos olyan emésztés-élettani tulajdonsággal rendelkezik, mint a legtöbb pontyféle (Lawrence 2007).

A halak etetése szempontjából két módszer alkalmazható, ez az igény szerinti történő takarmányozás, illetve a testtömeg alapján történő etetés. Az *ad libitum* takarmányozásnak számos nehézsége van, mivel nagyon könnyen túletethetjük az állatokat és különösen fél-statikus rendszerekben, vagy toxikológiai tesztekben ez a vízminőség gyors romlásához vezet (Lawrence 2007). A toxikológia vizsgálatok során alkalmazott *ad libitum* etetés során a legjobb, ám legtöbb időt igénylő megoldás, ha egymás után kisebb és csökkenő adagokban történik az etetés, így elkerülhető a túletetés és a pazarlás.

A testtömeg alapján történő etetés során az egyes korosztályoknál különböző arányt lehet és kell alkalmazni. Míg lárva korban a testtömeg 30-200%-át szükséges adni naponta, felnőtt egyedeknél ez 1-10%. A felnőtt állatok esetében az elterjedt gyakorlat a testtömeg 4%-át kitevő napi takarmány etetése (Lawrence 2007). Ehhez természetesen szükséges ismerni az adott korosztály testtömegét. Az etetés gyakorisága is fontos szempontja a takarmányozásnak. A fiatal egyedeknél a napi háromszori vagy többször történő etetés is elképzelhető, míg a felnőtt egyedeknél legalább napi kétszeri etetés szükséges. Minden esetben azonban az adott labor körülményei, a vizsgálat típusa határozza meg az etetés gyakoriságát és az alkalmazott módszert (Lawrence 2007).

A teljesértékű takarmányok mellett az élő eleség is fontos részét képezi a zebradánió laboratóriumi takarmányozásának. Ez különösen a fiatal egyedek számára fontos, hiszen a *Paramecium*, a keresfereg (*Rotifera*) és az *Artemia* naupliusz etetése növeli a lárvák túlélését és

elősegíti a gyorsabb növekedését (Watts et al. 2012). Az élő táplálék vizuálisan ingerli a halakat, de könnyű emészthetőségével jobban hasznosul, ami különösen az elúszó lárvák számára fontos (Cahu és Zambonino Infante 2001). Egy vizsgálatban a pusztán *Artemia* naupliusszal etetett fiatal lárvák túlélése és növekedése nem volt jobb, mint a csak teljesértékű táppal etetett csoporté (Carvalho et al. 2006). Ennek valószínű oka azonban nem csupán a beltartalmi értékektől függ. A zebradánió lárvák szája igen apró, az elúszó egyedek csupán a 100 µm-nél kisebb átmérőjű táplálékot tudják elfogyasztani (Lawrence 2007). Éppen ezért a 500×100–150 µm (H×SZ) *Artemia* naupliuszokat a fiatal lárvák nem tudják megfogni (Carvalho et al. 2006). Ilyen fiatal állatokat ezért papucsállatkákkal (*Parameciummal*) (150-200 µm) és kerekeshéreggel (~250 µm) sokkal eredményesebb takarmányozni. Ezen szervezetek laboratóriumi alkalmazásának azonban hátránya, hogy mivel édesvízi szervezetekről van szó, az el nem fogyasztott papucsállatkák és kerekeshéreg a szűrő rendszerben tovább élnek és szaporodnak, ami a biológiai szűrőket jelentősen megterheli. Az elúszó lárvák kiegészítő élő eleségeként lehetőség van a fonalféreg (*Nematoda*), mint a *Panagrellus redivivus* használatára, mely az akvaristák körében elterjedten használt lárvanevelő táplálék (Schlechtriem et al. 2004). Egyik előnye ezek alkalmazásának (kb. 50 µm átmérőjű és 1 mm hosszú fonalféreg) (Ricci et al. 2003), hogy az el nem fogyasztott egyedek egy-két órán belül elpusztulnak a vízben.

3.10 Akut toxicitás vizsgálatok halakon

A halakon végzett akut tesztek fontos részét képezik a különböző vegyületek okozta környezeti kockázat megismerésének. A jelenlegi Európai Uniós szabályozás értelmében minden forgalomba hozott vegyszer, peszticid, biocid, vagy gyógyszer esetében szükséges a kockázat becslése. Ez az EU vegyi anyagokra vonatkozó szabályozásával (REACH) együtt jelentős mennyiségben növelte az állatkísérletek számát (Scholz et al. 2008). Ezzel párhuzamosan viszont jelentős nyomás jelent meg a közvélemény és az ipar oldaláról is, hogy olyan alternatív megoldásokat keressenek a kutatók, melyekkel legalább részben helyettesíthetők az állat kísérletek és emellett az engedélyezés költségei, ha lehet, csökkenjenek. Több alternatív megoldás is adódott a környezeti kockázat becslésére, mint az *in silico* modell rendszerek, a különböző sejtkultúrákon történő tesztelések és a hal embrió modellek. Habár a legtöbb hal embrió alapú vizsgálatot zebradánión végzik, a kidolgozott tesztek medakán és tűzcsellén is alkalmazhatóak kis változtatásokkal (Braunbeck et al. 2005).

3.10.1 Akut vizsgálat felnőtt halakon

A felnőtt halakon történő tesztek fontos részét képezik például a gyógyszer és az állatgyógyászati vegyületek kockázatbecslési folyamatának (VICH 2004, EMA 2006). Az engedélyezési folyamatok mind az OECD 203 teszt alapján írják elő a vegyületek tesztelését. Ez a protokoll egyike a legrégebben (1992) változtatás nélkül használt OECD teszteknek (Wedekind et al. 2007).

Maga a teszt 96 óra hosszú kezelést ír elő, statikus, fél-statikussal, vagy átfolyó vizes körülmények között. A teszthez alkalmas szervezetek között számos faj megtalálható, mint a ponty, a szivárványos pisztráng, a medaka és a zebradánió. Természetesen minden faj esetében külön-külön követelmények vonatkoznak az állatok testméretére és a kezelőoldat paramétereire (hőmérséklet, ASV stb.). A protokoll emellett javasolja 100 mg/l-es limit teszt és szükséges határérték kereső teszt elvégzését is, a fő teszt elvégzésének megkönnyítéséhez.

A vizsgálathoz kiválasztott halakat a kontrol csoportok mellett legalább 5 koncentrációban kell tesztelni és legalább 7 halat kell egy koncentrációban vizsgálni. Maga a teszt nem írja elő párhuzamosok alkalmazását, mivel a végcélja a LC_{50} érték meghatározása. Ehhez statisztikai módszerként probit analízist javasol a szabvány, melyhez csak az egyes koncentrációkban szereplő állatok kiindulási számára és az elhullott állatok számára van szükség. Ennek ellenére érdemes legalább 2 ismétlésben elvégezni a kezeléseket, hiszen így megbízhatóbb eredményeket kaphatunk.

A kísérleti állatok számának csökkentésére vonatkozó elvárások természetesen a felnőtt halakra is vonatkoznak. Az akut felnőtt halas tesztek legjobb alternatívája a FET teszt (Wedekind et al. 2007). Ezt bizonyítandó Lammer et al. (2009) 143 vegyület esetében végeztek összehasonlító vizsgálatokat. Eredményeik alapján a zebradánió embriókon végzett vizsgálatok semmivel sem voltak kevésbé megbízhatóak, mint amikor a különböző halfajok felnőtt egyedein végzett akut tesztek LC_{50} eredményeit hasonlították össze.

3.10.2 Halembrió teszt (FET)

Zebradánió embriót egyre több tudományterület alkalmaz modell szervezatként és mint alternatív modellt, számos kutatási területen vonják be az eddig csak rágszálakon végzett vizsgálatokba. A legtöbb zebradánióval megjelent publikáció továbbra is a fejlődésbiológia, a molekulárisbiológia, sejtbioológia és a neurobiológia területén születik. A toxikológia, mint tudományterület a 8. helyen áll a zebradánió modelltként használó publikációk számának tekintetében. E mellett szignifikánsan nőtt az olyan hagyományosan rágszáló modellekkel dolgozó területeken a zebradánió alkalmazása, mint a gyógyszerterület, immunológia és kísérletes

medicina (Kinth et al. 2013). A toxikológiához kapcsolható pre-klinikai gyógyszeresztetekben és gyógyszerhatóanyagok fejlesztése során is egyre nagyobb szerepet kapnak a halembrió tesztek (Parng et al. 2002, Zon és Peterson 2005). Jó példa erre a daganatos megbetegedések kezelésére szolgáló gyógyszerek tesztelése és fejlesztése (Zon és Le 2008), illetve a transzlációs medicina területén is egyre elterjedtebbek ezek a vizsgálatok (Phillips és Westerfield 2014).

A legtöbb embrió akut toxicitás tesztet jelenleg is elsősorban környezetben megjelenő xenobiotikumokkal végzik. Németországban már 2005 óta része a szennyvizek tesztelésének a hal embrió teszt (Scholz et al. 2008) és hazánkban is 2009 óta elérhető a szennyvízminták halembriókkal történő tesztelésére szolgáló MSZ EN ISO 15088 szabvány.

Az OCED 2006-ban hozta nyilvánosságra az első vázlatát a halembriók különböző vegyületekkel végzett akut vizsgálatának (OECD 2006). Ebben a protokollban még 48 órás kezelést javasoltak és a kontrol csoportok mellett a legalább öt koncentrációban 40-40 embrió tesztelését. Az embriókat így két 24-es szövettényesztő lemezen lehetett elhelyezni, mely két független párhuzamosnak felelt meg, ezáltal lehetőség volt az LC₅₀ érték mellett a szub-letális hatások statisztikai módszerekkel való értékelésére is. Ezzel szemben a 2013-ban megjelent végleges protokoll (OECD 2013a) már koncentrációnként csak 20 egyeden írta elő tesztelést, a vizsgálat hossza ugyanakkor 96 órára nőtt. A teszt alapján minden szövettényesztő lemezen lévő lyukat önálló ismétlésként kell kezelni, így probit módszerrel meghatározható az LC₅₀ érték, azonban a deformitások megfigyelése csak leíró jelleggel jelenhet meg a teszt eredményei között. Ezzel sajnos a fontos szub-letális hatásokat nem lehet statisztikailag igazolni. Bár a módszer célja kifejezetten a letalitás és nem a teratogén hatások vizsgálta az adott vegyületek esetében, nem szabad elfelejteni, hogy a 2010/63/EU rendelet értelmében egy nem élőlényen végzett vizsgálatról van szó, így a vizsgálatok tervezésénél plusz ismétlések beiktatása nem ütközi a 3R elveivel.

3.11 Krónikus és szub-krónikus kitettség vizsgálata halakon

Az akut és a krónikus kitettség hatásának vizsgálatára irányuló tesztek között a legjelentősebb különbség a tesztek hosszán kívül a vizsgálati végpontok meghatározása. Míg az akut toxicitás tesztek elsődleges célja a letális hatás megállapítása, addig a krónikus tesztek többsége valamilyen jól körül írt szub-letális tünet dózis-hatás összefüggéseit vizsgálja. Mindez igaz az egyes kutatásokhoz tervezett vizsgálatokra és a szabványosított protokollokakra is. A krónikus tesztek végpontjait, ha csak a OECD protokollokat tekintjük, leginkább a halak növekedésre (OECD 1998, OECD 2013b), vagy a szaporodásbiológiai folyamatokra (OECD 2009, OECD 2011, OECD 2012, OECD 2015) gyakorolt hatásra irányulnak.

3.11.1 Korai életszakasz vizsgálat

Az OECD 210 szerinti hal korai életszakasz vizsgálat a leggyakrabban alkalmazott szubkrónikus toxicitást vizsgáló halteszt, melyet környezeti kockázatbecslésre használnak világszerte (Villeneuve et al. 2014). A halak korai életszakaszában történő toxikológiai vizsgálatokat már a 70-es években is javasolták alternatívaként a hal teljes életciklus vizsgálatok kiváltására (McKim 1977). A vizsgálat végpontjai a teszt végén a LOEC és NOEC értékek meghatározása, a mortalitás és a különböző testparaméterek tekintetében. A teszt hossza az egyes halfajok esetében változó, általában a keléstől számított 20-30 nap.

A teszt egyik legfontosabb tulajdonsága, hogy a halak legérzékenyebb fejlődési stádiumait foglalja magába és egyben ez adja a teszt nehézségét is. A tesztet a frissen termékenyült, néhány sejtes állapotban lévő embriókkal kell megkezdeni. A zebraadániók 2,5-3 dpf korban kezdenek kikelni, azonban ilyenkor még a szikihólyagból fedezik a szükséges tápanyagokat a növekedéshez (Westerfield 1995). Az ezt követő 2 napban a fejükön található sejtek által termelt váladékkal jellemzően egy függőleges felülethez tapasztják magukat (függeszkedés) (Laale 1977). 5 dpf korban kezdenek a lárvák szabadon úszni az úszóhólyag légköri levegővel való feltöltése után. Ezt követően körülbelül a 7 dpf korig a lárvák még a felvett táplálék mellett a szikihólyagból is képesek a tápanyagok mobilizálására. Erre azért van szükségük, mivel ebben az időszakban fejeződik be az emésztőrendszer funkcionális fejlődése (Pack et al. 1996, Holmberg et al. 2004). A korai életszakasz tesztben ez az egyik legfontosabb időszak, elsősorban a megfelelő etetési módszer kiválasztása és a fél-statikus kezelés esetében az oldatcsere miatt. A szabadon úszó halakról nagy körültekintéssel lehet csak az oldatot eltávolítani, mivel az állatok ekkor különösen sérülékenyek. Az etetés szempontjából nagyon fontos a már 5-6 dpf korú halak megfelelő méretű élő eleséggel való etetése, mivel az intenzíven mozgó zsákmány vizuálisan vonzó és intenzívebb táplálkozásra készíti a lárvákat, így a lassan süllyedő tápszemcsékből is többet fogyasztanak. Körülbelül 10-12 dpf korukban érik el a 4,2-4,5 mm teljes testhosszt. (Kimmel et al. 1995, Parichy et al. 2009) és ekkor már képesek elfogyasztani az *Artemia* naupliusokat.

Az OECD 210-es protokoll 1992-ben megjelent első változat szerint a kontrolok mellett minimum 5 koncentrációban, koncentrációnként 2 ismétlésben, minimum 30-30 embrióval javasolták a vizsgálat elvégzését. A két ismétlés azonban sokszor az alkalmazott statisztikai próbák miatt nem volt elegendő. Részben ez is volt az oka, hogy a 2013-ban kiadott változatban már 80 állat, négy ismétlésben való vizsgálatát javasolták minden koncentrációhoz. Az új protokoll a validálási kritériumaiban is szigorodott. Meghatározták a halak testparamétereiben az ismétlésekenkénti és az ismétlések közti megengedhető különbséget, illetve a kontrol csoport esetében a kelés utáni 70%-os túlélési minimum határt is módosították. A kelésig a kontrol

egyedek 70%-nak, kelés után pedig 75%-nak kell túlélnie a teszt érvényességéhez. Habár ezek a kritériumok elsősorban a GLP alatti engedélyezési és kockázatbecslési eljárásokhoz kerültek kidolgozásra, a kutatók számára is jó támpontot jelentenek a módosított, vagy átalakított protokollok az eredmények értékelésekor.

3.11.2 Többgenerációs vizsgálatok

Napjainkban egyre több figyelem fordul a környezetben megjelenő vegyületek hosszútávú, akár generációkon átívelő hatásának megismerésére. Minden többgenerációs vizsgálat fontos végpontja a halak szaporodásbiológiai paramétereinek vizsgálata, hiszen a környezeti kockázat felmérésénél ez mutatja meg a populáció szintjén megnyilvánuló hatásokat. Számos, irodalomban fellelhető munka többgenerációs vizsgálatokban a különböző EDC vegyületek hatásait tanulmányozta hal modellen, mint amilyen az etinil-ösztadiol és a biszfenol-A (Bhandari et al. 2015), az ösztron (Nakamura et al. 2015), vagy a nonilfenol (Holdway et al. 2008). Az EDC vegyületek mellett természetesen más vegyület csoportokat is tanulmányoztak több generációs halas tesztekben, mint a gyógyszer metabolit klofibrin sav (Coimbra et al. 2015), fényvédő krémek hatóanyaga a benzofenon-3 (Kim et al. 2014), vagy éppen a fitoszerolok (Nakari és Erkoma 2003) és szennyvíztelepek elfolyó vizeit (Sowers et al. 2009) is tesztelték ilyen kísérleti rendszerben. A kísérletek tervezésénél az EPA által korábban készített tanulmány (EPA 2003) és 2015 óta az OECD 240 (OECD 2015), a medaka többgenerációs vizsgálatát leíró szabvány szolgálhat alapul.

A vizsgált anyagokhoz hasonlóan a tesztek felépítése is elég változatos. A célzottan szaporodásbiológiai végpontot vizsgáló tesztek esetében a medaka alkalmazásának fő előnyét az adja, hogy ismert a hímspecifikus allélja az autoszómális *dmrt1* génnek (Schartl 2004), de a medaka mellett zebradánió, tüzcselle és más fajok is alkalmazhatóak modellállatként. A halak nevelése és tartása szempontjából az átfolyóvizes tesztrendszerek a legmegfelelőbbek és a legtöbb tesztet ilyen rendszerekben is végzik, valamint az OECD 240 protokoll is ilyen kezelést ír elő. Ezekkel a rendszerekkel azonban nagy mennyiségű szennyezett víz keletkezik, amelynek megfelelő kezelése nem egyszerű feladat. Természetesen fél-statisztikus rendszerekben is elvégezhetőek ezek a vizsgálatok (Sowers et al. 2009, Kim et al. 2014). A tesztelt koncentrációk tekintetében több példát találhatunk két (Fassbender és Braunbeck 2013a), 3 koncentráció (Saravanan et al. 2014), 4 (Kim et al. 2014), illetve 5 (Diekmann et al. 2004a) koncentráció vizsgálatára is a teljes életsiklus, vagy a több generációs tesztekben. Az EPA (EPA 2003) által készített áttekintő munka alapján a többgenerációs vizsgálatokhoz 2-4 ismétlést javasolnak. A csak két független ismétlést alkalmazó tesztekre is több példa található (Nakari és Erkoma 2003, Diekmann et al. 2004a, Fassbender és Braunbeck 2013a), az azonban elmondható, hogy a

kimondottan szaporodási paramétereket vizsgáló tesztek esetében legalább négy (Holdway et al. 2008, Kim et al. 2014, Nakamura et al. 2015) párhuzamost alkalmaznak, illetve az OECD 240-es protokoll is hat párhuzamost javasol.

Az ismétlésenként alkalmazott állatok számát alapvetően a vizsgálandó végpont és az ehhez alkalmazott módszerhez szükséges mintaszám határozza meg. Az OECD protokoll ismétlésenként 20 embrió kezelését javasolja a szaporodásbiológiai és testhossz vizsgálatához, míg az EPA tanulmány 50-100 embrióval javasolja elkezdni az F1 és az F2 generáció kezelését. Az viszont elmondható, hogy minél kevesebb egyeddel kezdik a vizsgálatot, annál jobban lehet követni azok fejlődését és így valószínűleg a lárvák életben maradási aránya is jobb lesz.

A teszt szerkezetére vonatkozóan is több lehetőség kínálkozik. A kezelés kezdődhet a P (szülői) generáció 2-3 hetes előkezelésével (Kim et al. 2014, Nakamura et al. 2015, OECD 2015), illetve az F0 vagy F1 generáció embriókorban történő kezelésével (Fassbender és Braunbeck 2013a, Fassbender és Braunbeck 2013b, Coimbra et al. 2015). A kezelés hossza is legalább ilyen változatos, a legtöbb vizsgálatban legalább az F2 generáció korai életszakaszát (30-60 nappal a kelést követően fajtól függően) magában foglalja a kezelés (Diekmann et al. 2004a, Nakamura et al. 2015, OECD 2015), de több kísérletben a megfigyelések kiterjedtek az F3 és későbbi generációkra is (Corrales et al. 2014, Bhandari et al. 2015, Coimbra et al. 2015).

A különböző tesztek és protokollok végpontjai között minden esetben szerepel az elhullás vizsgálata, a lerakott ikraszám, a termékenység és a megjelenő fejlődési rendellenességek, illetve az állatok testparamétereinek vizsgálata a különböző fejlődési állapotokban. Ezekon kívül természetesen szaporodásbiológiai végpontként a vitellogenin mérése szerepelhet még (Kim et al. 2014, OECD 2015), de akár genotoxikológiai (Fassbender és Braunbeck 2013a, Fassbender és Braunbeck 2013b) vizsgálati végpont is beilleszthető ezekbe a tesztekbe, nem beszélve a molekuláris biológiai vizsgálatokról.

4. ANYAG ÉS MÓDSZER

4.1 *A kísérletek helyszíne, az állatok tartása*

Az állatkísérleteket a Szent István Egyetem, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar, Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet, Halgazdálkodási Tanszékén végeztem. A vizsgálatokhoz AB vad típusú zebradánió vonalat használtam. A halakat, állandó vízátfolyást biztosító recirkulációs rendszerben (Tecniplast Zebtec, Tecniplast, Buguggiate, Olaszország.), 14 óra világos, 10 óra sötét világítási programon tartottam a vizsgálatok megkezdése előtt. A recirkulációs 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 halakat a naponta kétszer etettük SDS Small Gran (SDS – Special Diets Services Inc.) táppal, élő eleséggként hetente kétszer *Artemia spp.* (SERA GmbH.) naupliusz lárvát kaptak.

A vizsgálatokhoz felhasznált zebradánió embriók nyerésére a felnőtt egyedeket speciális, 1 literes szaporító edényekben ívattam (Tecniplast). A halakat az ívást megelőző nap délutánján helyeztem a szaporító medencékbe. A hím és a nőstény egyedeket a medencében egy átlátszó polikarbonát lemez választotta el. Az ívatas a következő reggel szinkronizáltan történt, a válaszfalak egy időben történő eltávolításával. Az ikrák összegyűjtését követően került sor az embriók válogatására, melyet sztereómikroszkóp alatt végeztem (Leica M205 FA), ezt követően kerülhettek az ép és szabályosan fejlődő embriók a tesztedényekbe.

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.

4.2 *Felhasznált anyagok*

A vizsgálatok során négy antineoplasztikus hatású vegyület hatását vizsgáltam, melyek az 5-fluorouracil (5-FU), a cisplatin (CisP), az etoposide (ET) és az imatinib mesylat (IM) voltak. Az 5-FU-t és a CisP-t a Sigma-Aldrich-től (Budapest, Magyarország, termék szám: F6627 az 5-FU és 479306 a CisP esetében), míg az ET-t és az IM-et a Santa Cruz Biotechnology-től szereztem be (Heidelberg, Németország, termék szám: sc-3512A az ET és sc-202180A az IM esetében).

A tesztanyagokból a vizsgálatokat megelőzően törzsoldatokat készítettem, majd az alkalmazott koncentrációkat ezen törzsoldatok hígításával állítottam elő. Az 5-FU tesztelésekor 100 mg/ml-es törzsoldatot alkalmaztam, melyhez a hatóanyagot dimetil-szulfoxidban (DMSO) oldottam fel, 3-5 perces rázatással (MTA KUTESZ, Type I). A CisP és az IM esetében 1 mg/ml-es törzsoldatot készítettem. Az IM és CisP esetében nem volt szükség oldószer alkalmazására, mindkét vegyület jól oldódott desztillált vízben (1. táblázat). Az ET vizsgálatához a vegyületet

az 5-FU-hoz hasonlóan DMSO-ban kellett feloldani. A törzsoldat végkoncentrációja ebben az esetben is 1 mg/ml volt. A kezelő oldat elkészítéséhez az oldatok hígítását a recirkulációs rendszerből vett tiszta rendszervízzel végeztem.

1. táblázat. A vizsgált vegyületek legfontosabb tulajdonságai

A táblázat a négy vizsgált molekula összegképletét, CAS számát, Anatómiai, Gyógyászati és Kémiai Osztályozási Rendszer (ATC, Anatomic Therapeutic Chemical Classification) kódját, oldhatóságát, savi disszociációs konstansát (pK_a), octano-víz megoszlási koefficiensét ($\log K_{ow}$), illetve moláris tömegét tartalmazza.

Vegyületek	5-fluorouracil	Cisplatin (cis-diamin-dikloroplatinum)	Etoposide	Imatinib mesylate
Kémiai formula	$C_4H_3FN_2O_2$	$H_6Cl_2N_2Pt$	$C_29H_32O_3$	$C_{30}H_{35}N_7O_4S$
CAS No.	51-21-8	15663-27-1	33419-42-0	220127-57-1
ATC kód	L01BC02	L01XA01	L01CB01	L01XE01
Oldhatóság	10–50 mg/mL	2,5 mg/mL	29 mg/mL	200 mg/mL
	DMSO	H ₂ O	DMSO	H ₂ O
pK_a	8,1	5,06	9,8	12,45
$\log K_{ow}$	0,81	2,19	0,60	4,38
M (g/mol)	130,08	300,05	588,57	589,71

4.3 Akut tesztek

4.3.1 Akut felnőtt hal teszt

Az akut felnőtt halas vizsgálatokat az OECD 203 (OECD 1992a) vizsgálati protokoll alapján végeztem. A főtesztet megelőzően a dózistartomány meghatározásához un. határérték kereső (range finding) tesztet alkalmaztam. Ennek során a 1, 10 és 100 mg/l-es oldatot készítettünk minden vizsgált anyagból. Az előteszteket 1 literes polikarbonát medencékben végeztem el, minden medencébe 3 hal került. A fő tesztet csak azon anyagok esetében nem végeztem el, melyeknél a 100 mg/l-es koncentrációval kezelt halak közül egy sem pusztult el a vizsgálat ideje alatt. A 100 mg/l-es limit határértéket az OECD 203 (OECD 1992a) protokoll alapján határoztam meg. A vizsgálatba vont halak mindegyike 6-8 hónapos korú volt. A halak átlagos testtömege $0,3 \pm 0,1$ g, átlagos standard testhossza $2,5 \pm 0,5$ cm volt. A főteszteket 3 literes polikarbonát medencékben végeztem, minden anyag esetében statikus kísérleti beállítást alkalmaztam, 5 koncentrációval. A vizsgálat alatt a kezelőoldat hőmérséklete 24 ± 1 °C volt. Minden koncentráció esetében két ismétlést alkalmaztam, a medencékbe pedig 7-7 halat helyeztem. A vizsgálat időtartama az elő- és a főteszt esetében is 96 óra volt. A főtesztet a CisP-

al és az IM-el végeztem el (2. táblázat). A kontrol csoportokat rendszer vízben kezeltük a fentiekkel megegyező körülmények között két ismétlésben.

2. táblázat A vizsgálatban tesztelt két antineoplasztikus hatású vegyület felnőtt halak toxicitás vizsgálatainál alkalmazott koncentrációi.

Teszt anyag	koncentrációk (mg/l)
cisplatin	10, 50, 65, 80, 100
imatinib mesylate	1, 5, 10, 50, 70, 100

4.3.2 Akut embrió tesztek

Az akut embrió tesztek az OECD FET (Fish Embryo Toxicity Test) 2006 Draft guideline alapján terveztem. Ennek megfelelően az embriók legkésőbb 2 órával a termékenyülés után, a válogatást követően, még 8 sejtes állapot előtt kerültek a tesztedényekbe. A tesztek időtartamát 120 órára növeltem, hogy minél több információt tudjunk gyűjteni az anyag hatásáról. A tesztek minden anyag esetében 24-es szövettenyésztő lemezekben végeztem, minden koncentráció esetében 20 embriót vizsgáltam, két ismétlésben (3. táblázat). A kezelés statikus volt. 24 óránként vizsgáltam a mortalitást, illetve a szub-letális hatások megjelenését. Az 5-FU és az ET esetében oldószeres kontrol csoport is beállításra került.

3. táblázat A vizsgálatban tesztelt négy antineoplasztikus hatású vegyület embrionális toxicitás vizsgálatainál alkalmazott koncentrációi.

Teszt anyag	Vizsgált koncentrációk (mg/l)
5-fluorouracil	10, 100, 200, 1000, 2000, 3000, 4000
cisplatin	10, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 300, 500, 600, 1000
etoposide	0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450
imatinib mesylate	10, 50, 80, 100, 150, 200, 250, 300, 500

4.4 Keverék vizsgálatok az Imatinib és a Cisplatin esetében

4.4.1 Keverékek elkészítése

Két vegyület esetében végeztem el a keverékek hatásának vizsgálatát. Ezek a CisP és az IM voltak. Az oldatok készítését a fent leírt módon végeztem. Cisplatin/Imatinib keverék akut toxicitásának meghatározása során Cleuvers (2003), Brezovsek et al. (2014) és Thorpe et al. (2005) munkáját vettem alapul. A keverékekben használt koncentrációk kiválasztásakor a két anyag akut embrió vizsgálatából származó 96 órás mortalitás adatait vettem figyelembe.

A vizsgálathoz mindkét vegyület 96 órás expozícióra vonatkozó LC₅, LC₁₀, LC₂₀, LC₅₀ és LC₉₀ számított értékeit használtam fel (4. táblázat). A vegyületek azonos mortalitás értékeihez tartozó koncentrációk felének keveréke alkotta a kezelőoldatot (Cisplatin/Imatinib LC₅, LC₁₀, LC₂₀, LC₅₀, LC₉₀).

4. táblázat A CisP és a IM embrionális vizsgálatának számított mortalitás értékei
A keverékek összeállításánál a CisP és az IM esetében az LC₅, LC₁₀, LC₂₀, LC₅₀ és LC₉₀ értékeket vettem alapul.

	cisplatin (mg/l)	imatinib mesylate (mg/l)
LC ₅	13,18	43,44
LC ₁₀	37,59	59,91
LC ₂₀	67,17	79,84
LC ₅₀	123,74	117,99
LC ₉₀	209,88	176,07

A keverékek vizsgálata az OECD 236 FET teszt (OECD, 2013) alapján zajlott. Az OECD protokollban javasolt elrendezés helyett 3 ismétlésben végeztem a vizsgálatokat, ismétlésenként 10-10 embrióval. Az egyes ismétléseket külön 24-es szövetyenyésztő lemezre helyeztem, így egy lemezre 2 koncentráció egy-egy ismétlése és 4 kontrol embrió került. A vizsgálatot 2 alkalommal végeztem el.

A vizsgálat elvégzése során kapott eredmények alapján kiszámítottam az LC₅₀ értékeket a 96 órás expozíció után. Ez négy paraméteres logisztikus regresszió segítségével történt, melyben a négy paraméterből két paraméter volt fix. A két fix paraméter egyike a *c* paraméter volt, amely esetünkben a 0 érték. Ez a zéró mortalitást jelenti. A másik fixált érték pedig a *d* paraméter. Ez az érték a 100%-os mortalitást jelenti. A *b* érték a meredekséget jelöli, az *e* érték pedig LC₅₀ értéket. Az *x* érték (mg/l) pedig a koncentrációt (6. ábra).

$$f(x) = c + \frac{d - c}{1 + \exp(b(\log(x) - \log(e)))}$$

6. ábra: A citosztatikum keverék LC50 értékeinek meghatározására használt képlet

4.4.2 Prediktív keverék toxicitás

A rendelkezésre álló akut toxicitás eredmények alapján kiszámítottam a keverék prediktív toxicitásait is. Ennek során a koncentráció összeadódás módszerét alkalmaztam, mely a két anyag hasonló hatását, tehát a keverékek összetevőinek ugyanolyan, vagy hasonló

hatásmechanizmusát feltételezi a szervezetben. A keverékek becsült toxicitásának meghatározására egyrészt a koncentráció összeadódás (Concentration Addition-CA, Loew-féle addíció) Thorpe et al. (2005), másrészt a Brian et al. (2005) által alkalmazott módszert használtam (7. ábra).

$$ECx_{mix} = \left(\frac{p_1}{EC_{x_1}} + \frac{p_2}{EC_{x_2}} \right)^{-1}$$

7. ábra: Keverékek prediktív toxicitásának meghatározására szolgáló képlet, úgynevezett CA modell alapján (Concentration addition)

Jelen esetben a keverék becsült LC₅₀ értékét számoltam ki a fenti képlettel. A p_1 és a p_2 érték a CisP és az IM arányát fejezi ki a teljes keverék koncentrációban (nincs dimenziója). Az EC_{x_1} a CisP LC₅₀ értékét, és az EC_{x_2} az IM LC₅₀ értékét jelenti. A kapott LC₅₀ értékeket összehasonlítottuk a már kiszámított keverékeink LC₅₀ értékeivel.

A prediktív toxicitás becslését elvégeztem a független hatás módszerének (Independent Action – IA, Bliss-féle független hatás) vizsgálatával is, melyhez Cleuvers (2003) munkáját vettem alapul. Ennél a modellnek feltételezzük a két anyag esetében az egymástól független hatásmechanizmust és eltérő célterületet (8. ábra).

$$E(c_{mix}) = 1 - [(1 - E(c_1))(1 - E(c_2))]$$

8. ábra: Keverékek meghatározására szolgáló képlet, úgynevezett IA modell alapján (Independent Action)

Ahol $E(c_1)$ és $E(c_2)$ az egyes vegyületek önálló LC értékeit jelöli, míg az $E(c_{mix})$ vegyületek együttes hatása a keverékben.

4.5 Szub-krónikus vizsgálatok fiatal zebradánió egyedeken

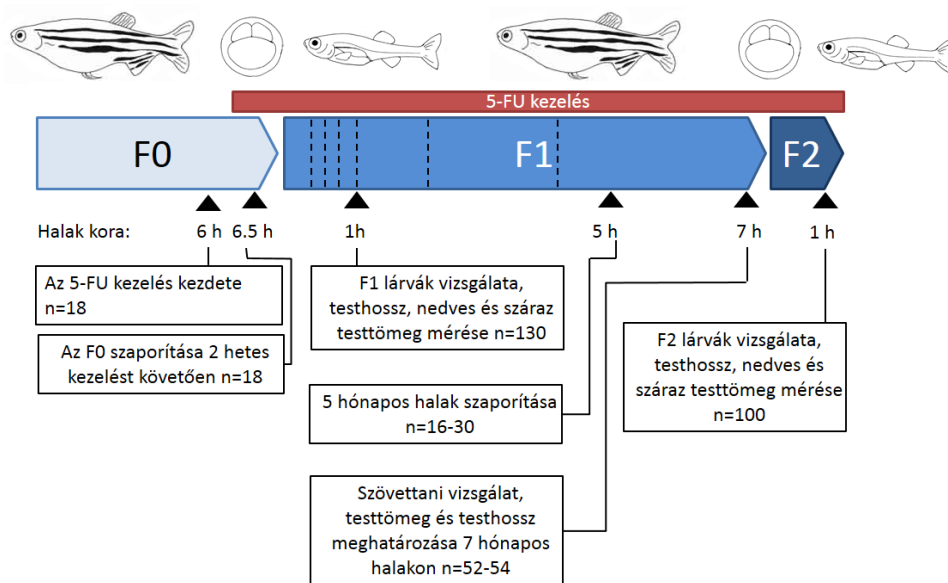
A korai életszakasz vizsgálatokhoz az OECD 210-es vizsgálati (OECD 1992b) protokollját vettem alapul. Ezt a vizsgálatot az 5-FU és az IM esetében végeztem el, melynek elsődleges célja az volt, hogy megismerjük ennek a két anyagnak a szub-krónikus hatásait a halak korai fejlődésére. A tesztek során igyekeztem széles koncentráció tartományt vizsgálni, ezért az 5-FU esetében 10 és 100 ng/l, 1, 10, 100 µg/l, valamint 1 és 10 mg/l-es koncentrációkat alkalmaztam. Az IM esetében 100 ng/l, 1, 10 és 100 µg/l, valamint 1 és 10 mg/l voltak a tesztelt koncentrációk. Az 5-FU vizsgálata során oldószeres kontrol csoportot is beállítottam 0,01%-os koncentrációban (100 µl/L). Minden kezelt csoport esetében a DMSO mennyiségét 100 µl/L -re egészítettem ki. A tesztek időtartama 33 nap volt. Minden kezelési csoport esetében 2 ismétlést alkalmaztam, ismétlésenként 50-50 embrióval. A vizsgálat kezdetekor a FET teszthez hasonlóan az embriókat

8 sejtes állapot előtt helyeztem a kezelőoldatba, előzetes válogatás után. A kezelések mindkét esetben fél-statikus rendszerben folytak. A korai életszakasz vizsgálatok esetében az embriók és lárvák kezelését kezdetben 10 cm átmérőjű Petri-csészékben végeztem. Az embriókat naponta tiszta Petri-csészébe és előkészített friss oldatba helyeztem. 5 napos lárvá stádiumban a lárvák nagyobb méretű (15 cm átmérőjű) Petri-csészékbe kerültek. A tesztoldatot naponta cseréltem ebben az esetben is. 15 nap után a lárvákat 11-es tesztedényekben kezeltem tovább a vizsgálat végéig. A tesztoldatot naponta részlegesen cseréltem (legalább 2/3 részben). Kétnaponta a halakat óvatosan tiszta edénybe helyeztem, friss tesztoldatba. Az elhullást naponta feljegyeztem a vizsgálat teljes ideje alatt. A vizsgálat végén a halkat 0,02 % Tricaine (Tricaine methanesulphonate; CAS. 886-86-2, Sigma-Aldrich) oldattal túlaltattam, majd lemértem a nedves testtömegüket és mikroszkóp segítségével fotókat készítettem a halakról a standard testhossz leméréséhez, melyhez ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>) szoftvert használtam. A 24 órás száraz testtömeget (60 °C, Thermos Scientific, Heratherm OGS 60) is lemértem, melyhez analitikai mérleget használtam (Mettler-Toledo AB204-S). A halakat a nagyon kis egyedsúlyok miatt, 5-ös csoportokban mértem le mind a nedves, mind a száraz testtömeg vizsgálatok esetében.

4.6 5-fluorouracil többgenerációs vizsgálata zebradánió

A kísérlet során a halakat fél-statikus rendszerben és 3 koncentrációval kezeltem, melyek 10 ng 5-FU/l, 1 µg 5-FU/l és 100 µg 5-FU/l voltak. A koncentrációk kiválasztásakor figyelembe vettem a korábbi korai életszakasz teszt eredményeit, továbbá az irodalomban szereplő környezeti koncentrációkat (Kosjek és Heath 2011, Kosjek et al. 2013, Lin et al. 2014). Minden kezelési koncentrációnál és az oldószeres kontrol csoport esetében is literenként 1 µl DMSO volt az oldatban. A vizsgálat alatt az oldószeres kontrol mellett negatív kontrol csoportot is alkalmaztam (9. ábra). Minden kezelési csoportnál két ismétlést alkalmaztam (A és B csoport). A vizsgálat során a halakat 25±1 °C-on tartottam.

A vizsgálat felépítésének és a teszt hosszának kialakításához elsősorban az EPA (2003) által publikált tanulmányt vettem alapul. A vizsgálat a kétgenerációs vizsgálati beállításokra támaszkodik, mely az F0 generáció már felnőtt, ivarérett egyedeinek szub-krónikus kéthetes előkezelésével kezdődik. Az F1 generációt teljes életciklusa alatt, míg az F2 generációt csak a korai életszakasz során volt kitéve a vizsgált anyag hatásának.



9. ábra Az 5-FU több generációs vizsgálat során alkalmazott vizsgálati terv sematikus ábrája

4.6.1 F0 generáció

A vizsgálat az ivarérett, fél éves AB adult egyedek kiválasztásával kezdődött. A teszt megkezdése előtt a halakat többször szaporítottam és csak a 90 %-os termékenyülési arányt és semmilyen fejlődési rendellenességet nem mutató utódokat adó egyedeket vontam be a kezelésbe. Ismétlésenként 7 nőstény és 11 hím halat 8 literes polikarbonát medencében kezeltem, fél-státikus rendszerben. A halakon hetente kétszer cseréltem oldatot. Minden oldatcsere során megtörtént a medencék takarítása is.

A kezelés időtartama 2 hét volt. Ezt követően a halakat ívattam. A szaporításból származó termékenyült embriók közül ismétlésenként 130 embrióút választottam ki véletlenszerűen az F1 generáció felneveléséhez. A halakat naponta kétszer etettem. Az egyik etetés alkalmával SDS Small gran száraz táppal, míg a másik alkalommal frissen kelt *Artemia spp.* naupliusz lávával etettem őket.

4.6.2 F1 generáció

A fejlődő embriók kezelését a 10 cm-es Petri csészében végeztem az elúszó lárva stádiumig (5 dpf). A már elúszó és táplálkozó lárvákat ezután 1 literes polikarbonát medencékbe helyeztem fél liter kezelő oldatban. 14 dpf-től egy liter oldatban tartottam a lárvákat. A lárvákat naponta kétszer etettem SDS 100-as táppal. 10 dpf-től naponta egyszeri *Artemia spp.* naupliusz lávával egészítettem ki a halak etetését. A medencék aljáról minden nap eltávolítottam az el nem fogyasztott tápot, megelőzendő a víz minőségének romlását. Az F1 generáció kezelése során az első hónapban minden második napon részleges, minden harmadik napon teljes oldatcsere-t végeztem. 21 dpf után a lárvákat 3 literes polikarbonát medencékbe helyeztem át és 1,5 liter

oldatban tartottam őket. Ekkortól kétnaponta történt oldatcsere, valamint szükség volt levegő beporlasztásra, hogy a 60% felett maradjon a víz oxigén telítettsége (ASV). Az oxigén mérését naponta végeztem Hach Lange HQ40 d mérőműszer segítségével.

33 nappal a termékenyülés után a további nevelésre nem szánt lárvákat 0,02%-os Tricaine oldatban túlaltattam. A testparaméterek mérése céljából a tovább nevelésre nem szánt halakról a korai életszakasz vizsgálatoknál bemutatott módon fényképet készítettem, illetve lemértem a nedves és száraz testtömegüket. A standard testhossz leméréséhez ImageJ programot használtam.

5. táblázat A tovább nevelt egyedek száma az F1 generációban

A többgenerációs vizsgálatok során az F1 generáció tovább nevelését a táblázatban szereplő számú fiatal egyeddel kezdtem az egyes csoportok esetében a korai életszakasz teszt végén (33 dpf).

kezelt csoportok	F1 továbbnevelt halak száma	
	5-fluorouracil	imatinib mesylate
K _A	55	45
K _B	55	45
DMSO _A	42	-
DMSO _B	55	-
10 ng/l _A	55	45
10 ng/l _B	54	45
1 µg/l _A	50	45
1 µg/l _B	44	45
100 µg/l _A	55	45
100 µg/l _B	55	45

Ismétlésenként az 5. táblázatban látható számú fiatal egyedeket neveltük tovább. A pozitív kontrol A csoportjának, az 1 ng/l B csoportjának és az 1 µg/l mindkét csoportjának esetében kevesebb halal tudtam csak a vizsgálatot folytatni a nagyobb fiatalkori elhullás miatt. A halak továbbnevelését a 33 dpf után 3 literes medencékben folytattam, már 3 liter kezelő oldatban. A kezelés ezen pontjától kezdve hetente kétszer végeztem oldatcserét. A második hónaptól a halakat 8 literes polikarbonát medencébe helyeztem át, 5 liter oldatba. A második hónap második felében a vízteret 8 literre növeltem. A halak takarmányozása a növekedésüknek megfelelő szemcseméretű SDS táppal (200, 300, 400, Small gran) történt, *Artemia* lárva kiegészítés mellett. A már ivarérett halakat az ötödik hónapban kezdtem szaporítani 5 héten keresztül, heti rendszerességgel, Tecniplast szaporító edényekben, ismétlésenként 12 random kiválasztott szülőpárral. A szaporítások után meghatároztam a szaporító edényenként lerakott összes ikraszámot, illetve két minőségi kategóriába soroltam az ikraszemeket aszerint, hogy

termékenyültek-e, vagy sem. Az ikraszemek vizsgálatát és számlálását fekete háttér előtt végeztem, szabad szemmel. Termékenyültnak számított az az ikraszem, amely a lerakást követően minimum két óra elteltével ép, szabályosan osztódó embriót tartalmazott. A nem termékenyült kategóriába az opálos (apoptotikus), vagy torzán osztódó embriókat tartalmazó ikrák kerültek. Az ötödik szaporítás után az egy ismétlésből származó ikratételeket összekevertem és véletlenszerűen kiválasztott 100 termékenyült ikrát (F2 generáció) került tovább nevelésre.

Az F1 generáció felnőtt egyedeit tovább kezeltem az F2 generációval párhuzamosan. A halakból hét hónapos korukban, 0,02 %-os Tricain-el történt túlaltatás után mintát vettünk szövettani vizsgálatokhoz. Ehhez a halak hasát felvágtam, majd 8%-os pufferolt formaldehidbe (Molar Chemicals Kft.) helyeztem. A halak standard testhosszának leméréséhez a túlaltatott állatokról fényképet készítettem (Pentax Optio RZ10), majd ez alapján ImageJ szoftver segítségével mértem le a halak testhosszát. A nedves testtömeg lemérését analitikai mérlegen végeztem (Mettler-Toledo AB204-S).

4.6.3 F2 generáció

Az F2 generáció nevelése az F1 generációnál ismertetett módon történt. 33 nappal az ikrák termékenyülése után fejeztem be az állatok kezelést. Az állatok 0,02%-os Tricaine-el történt túlaltatása után az F1 generáció és a korai életszakasz vizsgálatokban leírt módon lemértem a halak standard testhosszát, illetve a nedves és a száraz testtömegét.

4.6.4 Szövettani vizsgálat

A 8%-os pufferolt formaldehidben rögzített halak felszálló alkoholsorban történt víztelenítés után xilollal impregnálva 56 °C-on Paraplast-ba kerültek beágyazásra,. A 3-4 µm vastagságú metszetek festése deparafinálás után hemalaunnal és eozinnal történt. A metszetek vizsgálata mikroszkóp alatt történt.

4.7 *Imatinib multigenerációs vizsgálat*

Az imatinib mesylate több generációs vizsgálata során, az 5-FU-hoz hasonlóan, három koncentrációt alkalmaztam, melyek a 10 ng/l, 1 µg/l és 100 µg/l voltak. Az 5-fluorouracil vizsgálatának tapasztalatai alapján több változtatást végeztem a vizsgálati tervben. Ennek elsődleges célja az volt, hogy az imatinib esetében még hangsúlyosabban vizsgáljam a szaporodási képességben bekövetkező változásokat. A következőkben csak a különbségekre

térek ki a vizsgálat felépítésének ismertetésekor, minden egyéb paraméter megegyezett az 5-FU esetében bemutatottakkal.

4.7.1 F0 generáció

Hasonlóan az 5-FU-hoz itt is medencénként 8 nőtény mellett 11 hím egyedet kezeltem ismétlésenként. Az oldatcsere azonban itt már heti három alkalommal történt, az imatinib gyorsabb bomlása és kisebb stabilitása miatt (Negreira et al. 2013a).

4.7.2 F1 generáció

Az F1 generáció nevelése 150-150 termékenyült ikrával kezdődött ismétlésenként. Hasonlóan az első több generációs vizsgálathoz a halakat ebben a vizsgálatban is 33 nap után két csoportra választottam szét. A korai életszakaszban a halak nevelése az 5-FU esetében bemutatott módon zajlott. Minden ismétlés esetében 45 egyedet választottam ki továbbnevelés céljára, míg a többi egyedet az első vizsgálatban már ismertetett módon elaltattam a különböző testparaméterek felvételéhez (5. táblázat).

A tovább nevelt halak ismétlésenként 3 literes medencékbe kerültek, melyeken az 5 fluorouracil-al szemben hetente háromszor történt oldatcsere, a nevelés minden egyéb lépése megegyezett az 5-FU esetében ismertettekkel.

A halak szaporítása 5 és fél hónapos korokban kezdődött meg és 9 héten át zajlott. Az egyes szaporítások során a lerakott ikrák száma került meghatározásra a korábbi vizsgálathoz hasonlóan. Ebben az esetben is két minőségi kategóriát határoztam meg a lerakott ikraszemek esetében. Az ikraszemek megszámlálása után a termékenyült ikraszemek közül véletlenszerűen kiválasztott ikratételen megvizsgáltam a termékenyülési eredményt 24 órával a termékenyülés után. Ehhez az ikraszemekből ismétlésenként két 50, illetve kevesebb kapott ikra esetén 40, vagy 35 ikrából álló tételt különítettem el, majd 24 óráig 26 °C-on inkubáltam. A 24 órás termékenyülést minden esetben százalékosan fejeztem ki.

A vizsgálat végén, a halak túlaltatását követően, az 5-FU vizsgálatkor már bemutatott módon történt az F1 egyedek testparamétereinek felvétele. A halak testtömegének és testhosszának lemérésén kívül, minden egyed esetében boncolással meghatároztam az állatok nemét, mely alapján meghatározhattam az ivararányt is.

4.7.3 F2 generáció

Az F2 egyedek nevelését a felnőtt F1 egyedek 9. szaporításából származó embriókkal kezdtem meg. Minden ismétlés esetében 150 embrióval kezdődött a vizsgálat, hasonlóan az F1

generációhoz. Emiatt módomban állt összehasonlítani a két generációt az egy hónapos kezelés után. A testparaméterek mérése a F1 generáció és az 5-FU esetében bemutatott módon történt.

4.8 Statisztikai értékelés

4.8.1 Akut vizsgálatok

A FET tesztek esetében az LC₅₀ értékek meghatározásához Minitab 16 (Minitab, Coventry, UK) programcsomagot használtam. A LC₅₀ értékek kiszámításához a protokollokban is ajánlott probit analízist alkalmaztam, 95%-os konfidencia intervallum mellett. A szub-letális hatások dózis-hatás összefüggésének értékelésekor nem lineáris regressziót alkalmaztam és az EC₅₀ számításához a GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, USA) programcsomagot használtam.

A felnőtt halakon végzett vizsgálatok esetében szintén az OECD protokollt vettem alapul a kiértékeléskor. Ez alapján, hasonlóan a FET teszthez, ezeknél a teszteknel is Minitab 16 (Minitab, Coventry, UK) programcsomag segítségével probit analízist alkalmaztam a LC₅₀ értékek kiszámításához, 95%-os konfidencia intervallum mellett.

4.8.2 Keverékek vizsgálata

A vizsgált anyagok keverékeinek statisztikai elemzését az R program drc csomagjának segítségével végeztem el (R Development Core Team 2013). A nyers adatainkból mortalitást számoltam 96 órás expozíció mellett, majd logisztikus illesztést végeztem.

A következtetéseket minden esetben 95%-os megbízhatósági szinten hoztam meg ($p \leq 0,05$).

4.8.3 Szub-krónikus vizsgálatok

A korai életszakasz vizsgálat során a mortalitás LOEC és a NOEC értékek meghatározásához SPSS 14. szoftvercsomagot használtam. A két koncentráció határt független t próbával határoztam meg 95%-os konfidencia intervallum mellett. A test paraméterek vizsgálatokor GraphPad Prism 5.0 programot használtam. Az 5-FU esetében a testtömegek vizsgálatokor párosítatlan t próbát alkalmaztam, míg a testhossz eredmények értékelését egy szempontos varianciaanalízissel és Tukey's post hoc tesztet végeztem.

Az IM vizsgálat eredményeinek értékeléséhez GraphPad Prism 5.0 programot, egy szempontos varianciaanalízist és Dunnett's post hoc tesztet használtam szintén 95%-os megbízhatóság mellett.

4.8.4 Többgenerációs vizsgálatok

A kapott értékeket Microsoft Excel programmal dolgoztam fel. A következtetéseket minden esetben 95%-os megbízhatósági szinten hoztam meg ($p \leq 0,05$). A statisztikai elemzést a GraphPad Prism 5,0 statisztikai programcsomag segítségével végeztem el.

A mortalitás eredmények összehasonlítását GraphPad Prism 5,0 statisztikai programcsomaggal végeztem, valamint Fisher exact tesztet használtam, 95 %-os megbízhatóság mellett.

A normál eloszlást mutató adatok esetében egy szempontos varianciaanalízist és post hoc tesztként Tukey's tesztet, míg a nem normál eloszlást mutató adatok Kruskal-Wallis tesztet, míg a csoportok összehasonlításához Dunn's tesztet alkalmaztam.

A szaporodásbiológiai eredmények értékelése során a lerakott ikrák számát normalizáltam az ikratételt adó nőivarú egyedek számával. Az IM F1 egyedek esetében meghatározott ivararány statisztikai értékeléséhez a százalékos eredményeket arcsin ($\arcsin(\sqrt{(x/100)})$) transzformációnak vettem alá.

5. EREDMÉNYEK

5.1 Adult egyedek vizsgálata

A felnőtt halakon végzett határérték kereső teszt során sem az 5-FU, sem az ET esetében nem tapasztaltunk elhullást a 100 mg/l- es kezelésnél.

A Cisp vizsgálatokor a 96 órás teszt elvégzése után az LC₅₀ értéket 64,5 mg/l-ben határoztam meg a felnőtt egyedekre. Az IM akut toxicitás is hasonló mértékű volt, ennél a vegyületnél az LC₅₀ értéket 96 órás expozíció után 70,8 mg/l-ben állapítottam meg (6. táblázat).

6. táblázat Az akut vizsgálatok LC₅₀ eredményei.

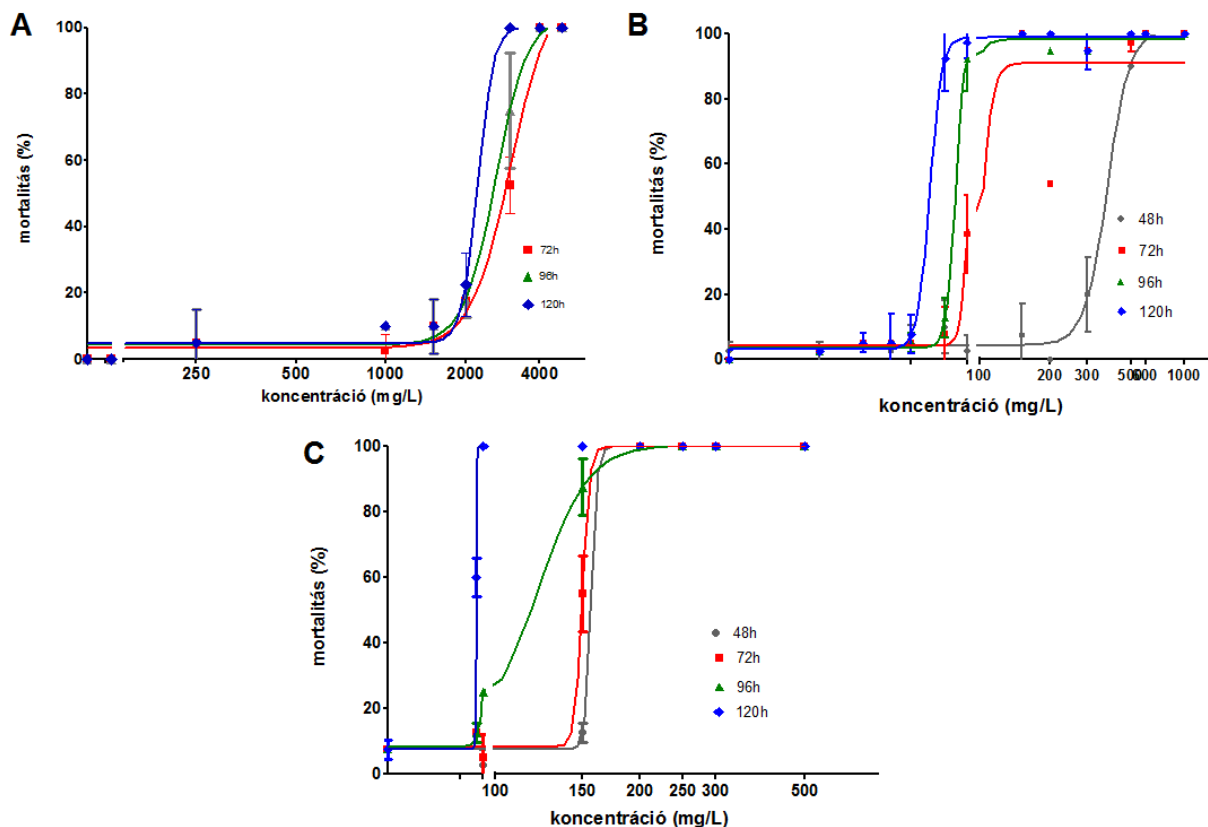
A táblázatban az akut tesztekben meghatározott LC₅₀ értékek láthatók az egyes expozíciós idők (óra=h) függvényében a felső és az alsó konfidencia intervallumok megadásával (CI). Az ET esetében a FET tesztnél nem sikerült meghatározni az LC₅₀ értékeket (nincs adat = NA).

Vegyület		Adult teszt		FET teszt		
		96 h	48 h	72 h	96 h	120 h
5-FU	LC ₅₀	> 100		2992	2610	2222
	felső CI			3206	2778	2462
	alsó CI			2792	2542	2006
CISP	LC ₅₀	64,5	349,9	198,2	123,7	81,3
	felső CI	69,2	387,5	223,0	139,2	90,9
	alsó CI	59,1	318,2	178,1	111,1	72,9
ET	LC ₅₀	> 100	> 300	> 300	> 300	> 300
	felső CI		NA	NA	NA	NA
	alsó CI		NA	NA	NA	NA
IM	LC ₅₀	70,8	158,3	141,6	118,0	65,9
	felső CI	81,1	170,7	152,9	127,8	71,6
	alsó CI	63,7	147,5	131,7	109,4	59,9

5.2 A halembrió toxicitás teszt (FET) eredményei

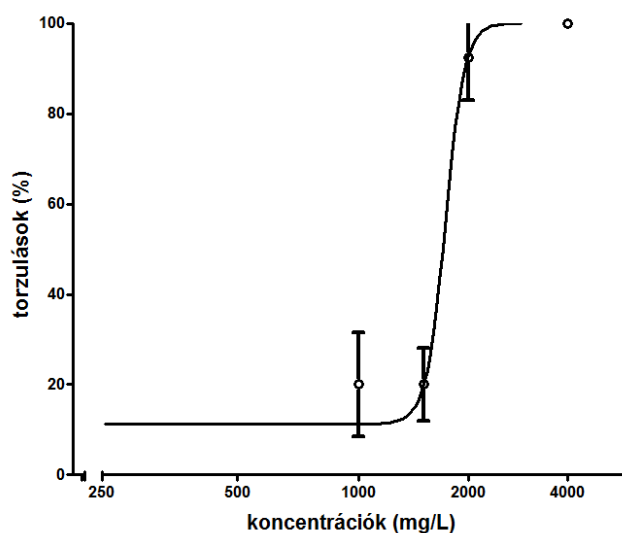
5.2.1 5-fluorouracil

A zebradánió embriók fejlődése során 24 óránként határoztam meg az LC₅₀ értékeket az egyes vizsgált vegyületek esetében. Az 5-FU vizsgálatokor, annak igen alacsony toxicitása miatt, csak 72 órával a termékenyülés után volt módom a mortalitás adatokból a legkorábbi fél- halálos koncentráció kiszámítására, mivel nem lehetett olyan magas koncentrációkat alkalmazni, melyek az állatok felének elhullásával jártak volna rövidebb kitétség mellett. 72 órával a termékenyülés után az LC₅₀ érték 2992 mg/l, 96 órával a termékenyülés után 2610 mg/l, míg 120 órával a termékenyülés után 2222 mg/l volt az LC₅₀ érték (10. ábra).

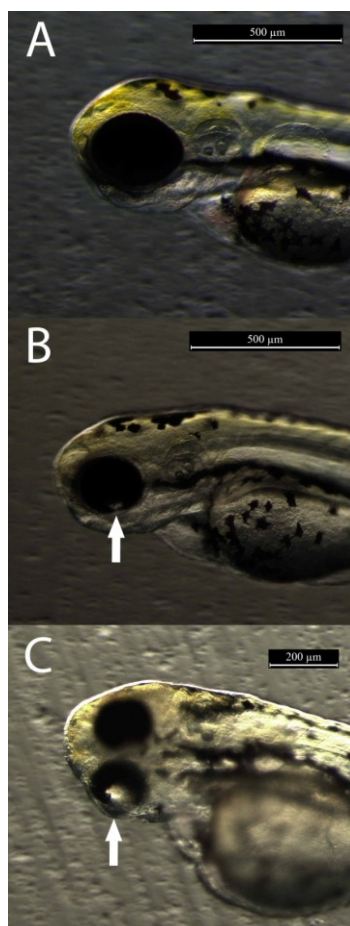


10. ábra A FET tesztek mortalitás dózis hatás görbéi az egyes kezeléseknél. A mortalitás változása különböző expozíciós idők mellett az 5-fluorouracil (A), a cisplatin (B) és az imatinib mesylate (C) esetében.

Az 5-FU embriókra gyakorolt hatásának vizsgálatok során különböző deformitásokat tapasztaltam, melyek megjelenése dózis-hatás összefüggést mutatott. Ezen deformitások alapján számított félhatásos koncentráció (EC_{50}) 1723 mg/l volt 120 órás kitettség esetében (11. ábra). A legjellemzőbb megfigyelt torzulás a farok ventrális irányba történő görbülése (lordózis) volt, mely az 1000 mg/l-t meghaladó koncentrációkban volt látható (14. ábra). Ehhez hasonlóan csak az 1000 mg/l feletti koncentrációknál volt megfigyelhető az embriók szemében az érhártya tökéletlen záródása (*fissura choroidea*) (12. ábra). Ilyen elváltozásokat sem a negatív, sem pedig az oldószeres kontrol csoportban nem találtam.



11. ábra. Az 5-FU FET teszt dózis-hatás görbéje a torzulások tekintetében
Az 5-FU vizsgálata során 120 órás kitettségnél az embriókon megfigyelt fark torzulások és ödémák esetében meghatározott EC₅₀ érték 1723 mg/l volt.

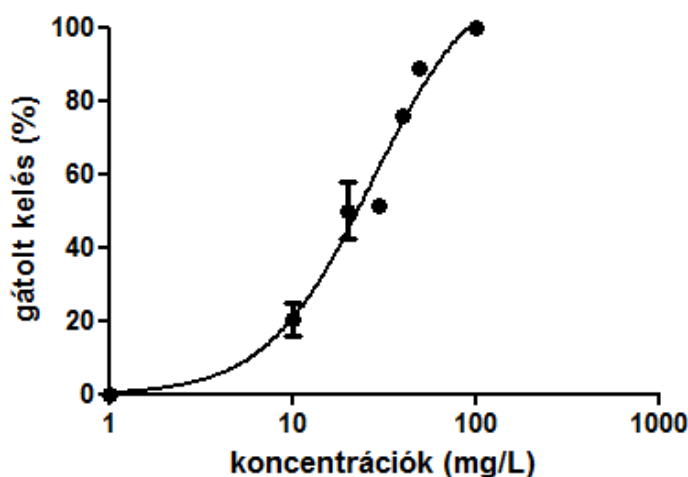


12. ábra Az 5-FU FET tesztje során megfigyelhető volt a szem érhártyájának tökéletlen záródása (A) Az 5-FU embriótesztekben használt oldószeres (DMSO) kontroll embrió, (B) 1000mg/l 5-FU-val kezelt és (C) 2000mg/l 5-FU-val kezelt embriók fejről készült felvételek (Rottermann kontraszt). A nyilak a *fissura choroidea* rendellenes záródását és az abnormális szemlencsét jelölik. Az elváltozás az 1000 mg/l-es és az annál töményebb 5-FU kezeléseknél jelentkezett. Méretskála: 500μm (A; B), 200μm (C).

5.2.2 Cisplatin

A Cisp, mint alkilező hatású antineoplasztikus vegyület már az 5-FU-nál jóval alacsonyabb koncentráció tartományban is toxikusnak bizonyult. Bár a LC_{50} érték 48 órás expozíció után meglehetősen magas volt (349,9 mg/l), a kezelés előrehaladtával ez az érték folyamatosan csökkent. 120 órás kitétség után az LC_{50} érték a lárvák esetében 81,3 mg/l volt. A 100 mg/l-es kezelés és az ennél magasabb koncentrációknál 120 órás expozíció végére az összes egyed elpusztult.

A koncentráció növekedésével csökkent a kikelt lárvák aránya. Míg a kontrol csoport az inkubáció hatására 72 órára kikelt, addig a 100 mg/l-esnél kisebb koncentrációkban ez a kelés gátlás jól megfigyelhető volt és dózis-hatás összefüggést mutatott. A még ikrahéjban lévő állatokon semmilyen morfológiai elváltozás nem volt megfigyelhető (14. ábra). A kelés gátlására számított EC_{50} érték 27,5 mg/l volt (13. ábra).



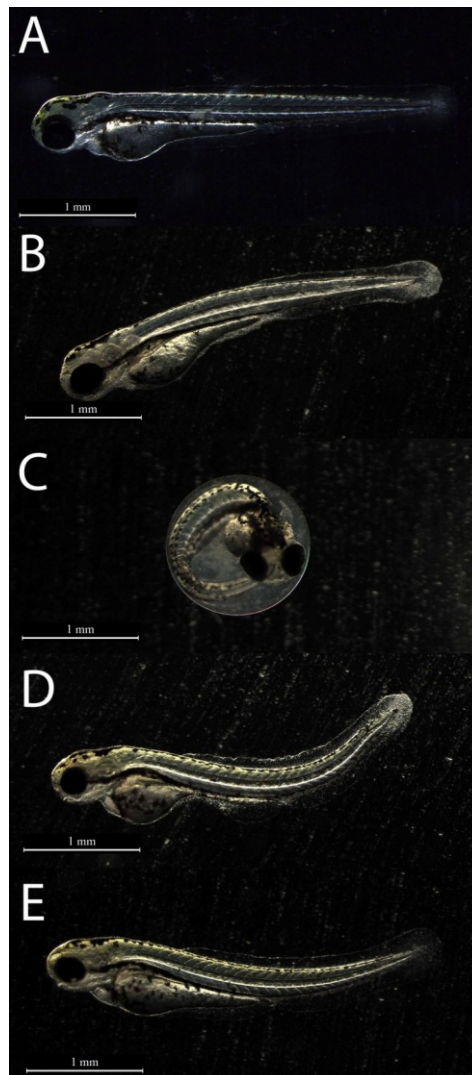
13. ábra. A cisplatin kezelés hatása a zebradánió embriók kelésére
A cisplatinnal kezelt embriók esetében a kelés gátlására meghatározott EC_{50} érték 27,5 mg/l volt.

5.2.3 Etoposide

A kísérletek során a legtöményebb előállítható ET oldat 300mg/l-es volt, efelett a koncentráció felett az anyag még oldószer (DMSO) használata mellett is minden esetben kikristályosodott. A vizsgálati idő alatt kezelt egyedeknél a pusztulás mértéke nem haladta meg az 50%-ot még az elkészíthető legnagyobb töménységű ET oldat esetében sem. A vizsgált időszakban az LC_{50} -értékek tehát meghaladják a 300mg/l-es felső oldhatósági határt. Az embriók morfológiai vizsgálata során különböző deformitások voltak felfedezhetők. Ezek a farok hátsó szakaszának különböző irányba történő görbülése, szik és perikardiális ödémák voltak (14. ábra).

5.2.4 Imatinib mesylate

Az imatinib vizsgálata során az expozíciós idő növekedésével csökkent az LC_{50} érték. Míg az LC_{50} 158,3 mg/l volt 48 órás expozíció után, addig 72 óra után 141,6 mg/l, 96 óra után 118,0 mg/l és 120 óra után 65,9 mg/l volt. Az IM-el kezelt embriók esetében a leggyakrabban megnyilvánuló deformitás a farok ventrális irányba történő görbülése volt. E mellett azonban egyéb elváltozások is megfigyelhetők voltak, mint például a 100 mg/l és annál nagyobb koncentrációk esetében a farok pigmentációjának csökkenése, különböző szik torzulások és pigmentációs zavarok megjelenése (14. ábra).



14. ábra Az egyes vegyületekkel kezelt embriókon megjelenő elváltozások (A) kontroll, normál fejlődésű embrió, (B) 1000 mg/l 5-FU-val kezelt, (C) 75mg/l cisplatinnal kezelt, (D) 300 mg/l etoposide-dal kezelt (E) 100 mg/l imatinib-bel kezelt embriók teljes testéről készült felvételek (Rottermann kontraszt). Méretskála: 1mm (A-E).

5.2.5 Keverékek vizsgálatának eredményei

A keverékek tesztelésekor számított Cisplatin/Imatinib keverék LC₅₀ értéke 53,1 mg/l volt a 96. órában, míg a CA módszerrel becsült LC₅₀ érték Cisplatin/Imatinib keverékének esetében 94,33 mg/l volt (7. táblázat). Az IA módszer alapján történő becslés sem jelezte előre pontosan a keverékek együttes hatását. A két antineoplasztikus vegyület együttes hatására az IA módszer becsült értéke az LC₅₀/2 keverékben 25,8% volt, míg a valós mortalitás érték elérte a 100%-ot (8. táblázat).

7. táblázat A Cisp és az IM keverékének CA módszerrel becsült és valós LC50 értéke 96 órás expozíció esetén

A két vegyület 96 órás LC₅₀ értékei mellett látható Brian et al. (2005) munkája alapján, a koncentráció összeadódás modellel becsült, valamint a vizsgálat során megfigyelt LC₅₀ értékek.

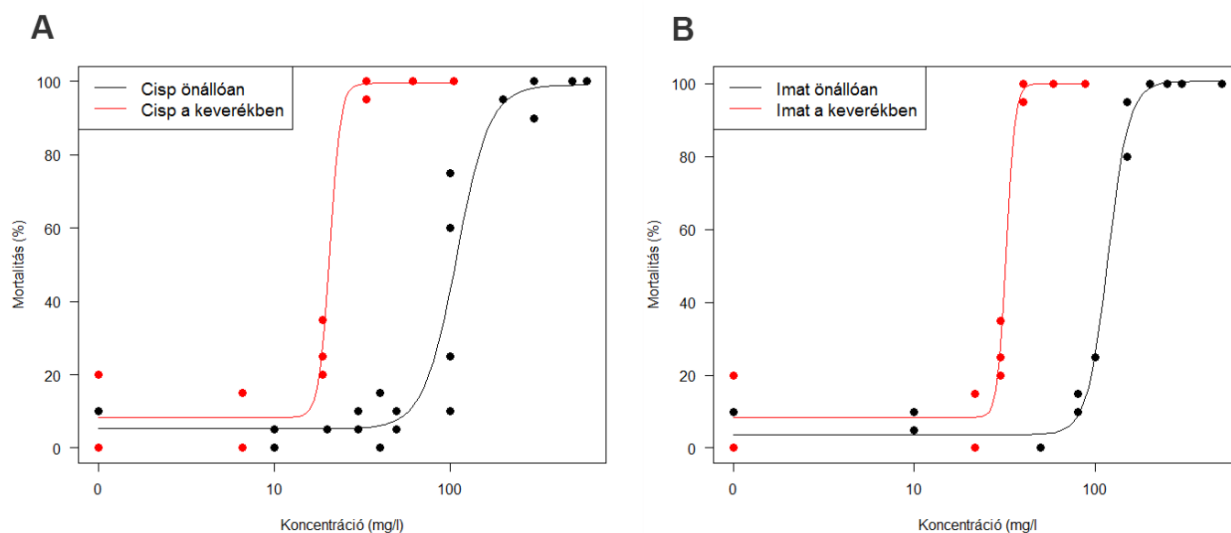
	Cisplatin	Imatinib	CA Prediktív	Keverék
LC ₅₀	123,7 mg/l	118,0 mg/l	94,33 mg/l	53,1 mg/l

8. táblázat A Cisp és az IM keverékének IA módszerrel becsült és valós LC50 értéke 96 órás expozíció esetén

A táblázatban az egyes keverékek összeállításához használt vegyületek és az adott vegyület koncentrációhoz tartozó önálló mortalitás értékek, valamint a becsült és a valós letális hatás látható. A keverékek hatásának vizsgálata során a független hatás módszerével történt becslés alapján látható volt, hogy a valós hatástól a becsült érték jelentősen eltért.

Keverék	CisP mortalitás %	IM mortalitás %	IA alapján becsült mortalitás érték %	Keverék valós mortalitás %
LC ₅ /2	4,1	1,8	5,8	10
LC ₁₀ /2	5,8	2,7	8,3	26,6
LC ₂₀ /2	9	4,1	12,7	98,3
LC ₅₀ /2	18	9,5	25,8	100
LC ₉₀ /2	38,5	27	55,1	100

A két vegyület együttes, erősebb hatását szemléletesen mutatja meg, ha a keveréket alkotó vegyületeket külön-külön ábrázoljuk az adott koncentrációk által, a keverékben okozott toxicitással és ehhez viszonyításképpen a vegyület önálló hatását ábrázoljuk (15. ábra).



15. ábra: A CisP és az IM keverékben és önállóan megfigyelt toxicitása a mortalitás tekintetében. A CisP (A) és az IM (B) esetében látható, hogy a keverékben alkalmazott koncentrációknál jóval magasabb mortalitást tapasztaltunk, mint az önálló vizsgálatoknál használt hasonló koncentráció tartományok esetén.

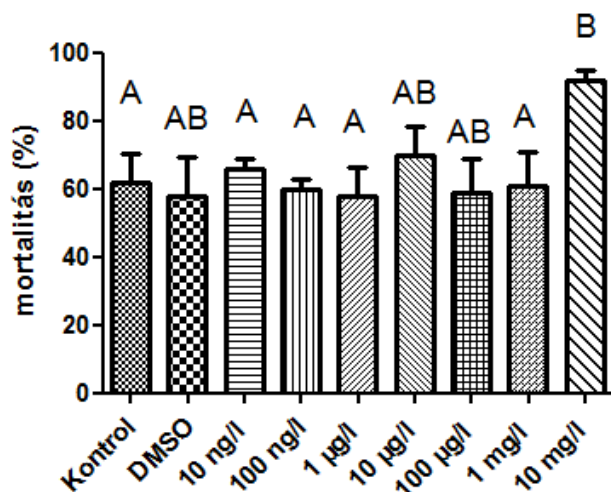
5.3 Szub-krónikus vizsgálatok

5.3.1 5-Fluorouracil

Az 5-FU szub-krónikus tesztelése során nem figyeltem meg deformitásokat sem az embriogenezis alatt, sem a posztembrionális fejlődés során a kezelt csoportoknál. Az embriók kelésében sem volt semmilyen eltérés a kontroll csoporthoz képest. Minden csoportban meghaladta a kelés a 85%-ot 72 órával a termékenyülés után.

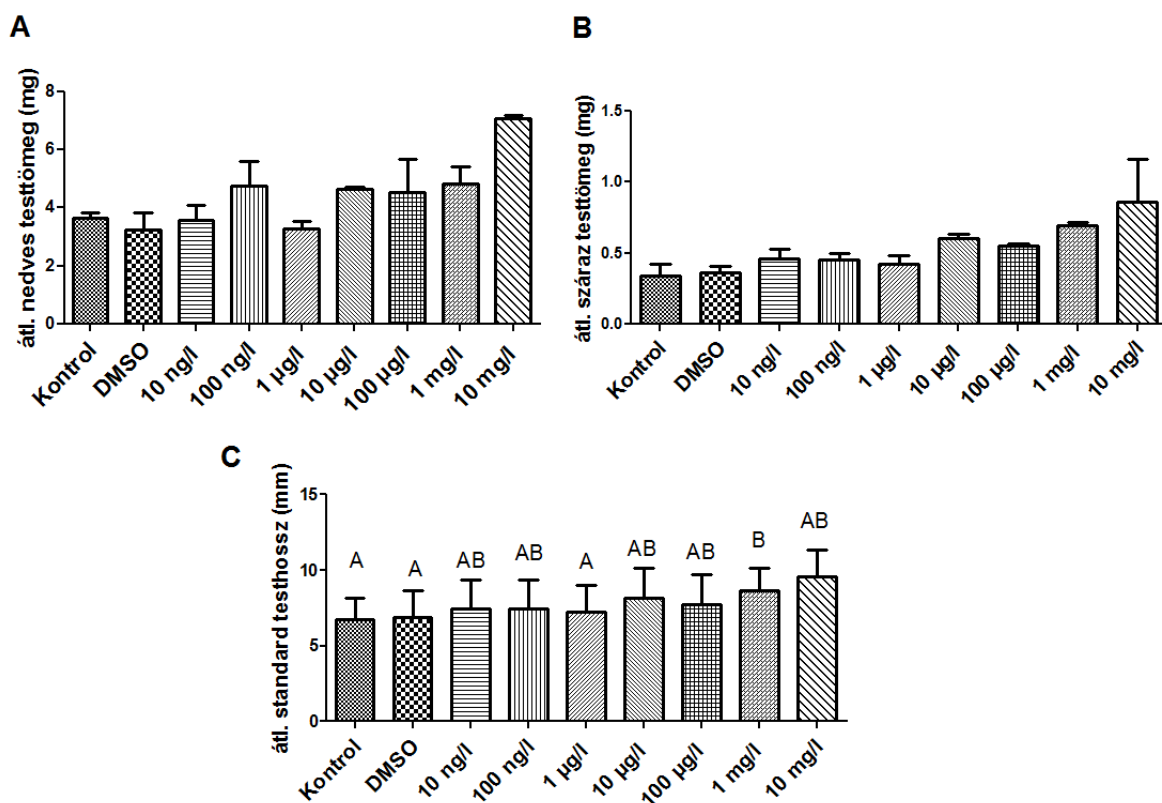
A vizsgálat teljes hosszának időtartamában szignifikáns eltérést a mortalitás tekintetében csak a legnagyobb (16. ábra), 10 mg/l-es kezelés (92%) esetében tapasztaltam (t-teszt, $p \leq 0,05$). A legkisebb mérhető toxikus hatás a pusztulás tekintetében (LOEC) így a 10 mg/l-es csoportnál volt megfigyelhető. Az oldószeres és a negatív kontroll csoportok között nem volt különbség a halak pusztulásának arányát tekintve.

A három mért testparaméter vizsgálata során, mind a nedves és a száraz testtömeg, illetve a standard testhosszok összehasonlításakor is találtam igazolható különbségeket. A száraz testtömeg, valamint a testhossz paraméterek alapján az 1 mg/l-es kezelésnél ($0,695 \pm 0,024$ mg, $8,644 \pm 1,529$ mm) a halak átlagosan nagyobbak voltak mint a kontroll ($0,343 \pm 0,08$ mg, $6,783 \pm 1,4$ mm) csoport egyedei, azonban ez csak a testhossz esetében volt statisztikailag igazolható (Kruskal-Wallis teszt, Dunns post-hoc teszt $p \leq 0,05$). Nedves testtömeg esetében csak a legnagyobb koncentrációnál volt látható ($7,06 \pm 0,12$ mg) növekedés a halak méretében ez azonban a kontrollhoz ($3,66 \pm 0,191$ mg) képest nem volt igazolható statisztikailag (Kruskal-Wallis teszt, Dunns post-hoc teszt $p \leq 0,05$, $p \leq 0,05$). Ez alapján a LOEC érték az 1 mg/l-es kezelés volt az 5-FU esetében (17. ábra).



16. ábra Az 5-FU-val kezelt halak korai életszakasza során tapasztalt pusztulás alakulása az egyes kezelésekben

A mortalitás alakulása az 5-fluorouracil korai életszakasz vizsgálat során az egyes kezeléseknél. A kontrol csoporttól egyedül a legnagyobb kezelés esetében volt szignifikáns eltérés (t-teszt, $p \leq 0,05$).



17. ábra Az 5-FU korai életszakasz vizsgálat halainak testparaméter eredményei

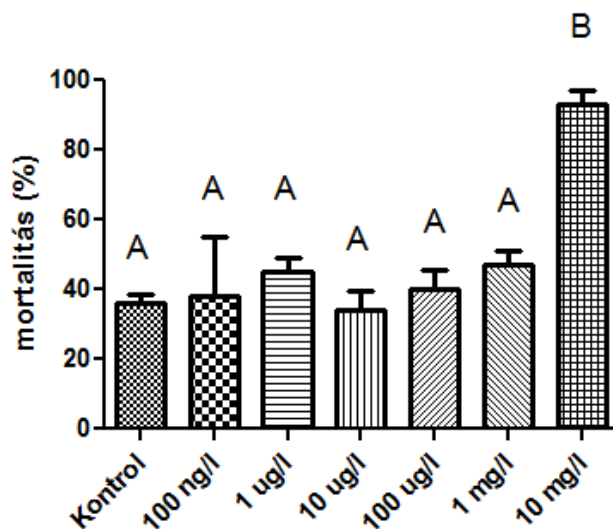
Az 5-fluorouracil korai életszakasz vizsgálatokor a nedves testtömeg (A) és a száraz testtömeg (B) esetében nem volt tapasztalható különbség a kezelések között. A standard testhossz tekintetében azonban már az 1 mg/l-es kezelés is szignifikáns különbséget mutatott (Kruskal-Wallis teszt, Dunns teszt $p \leq 0,05$).

5.3.2 Imatinib mesylate

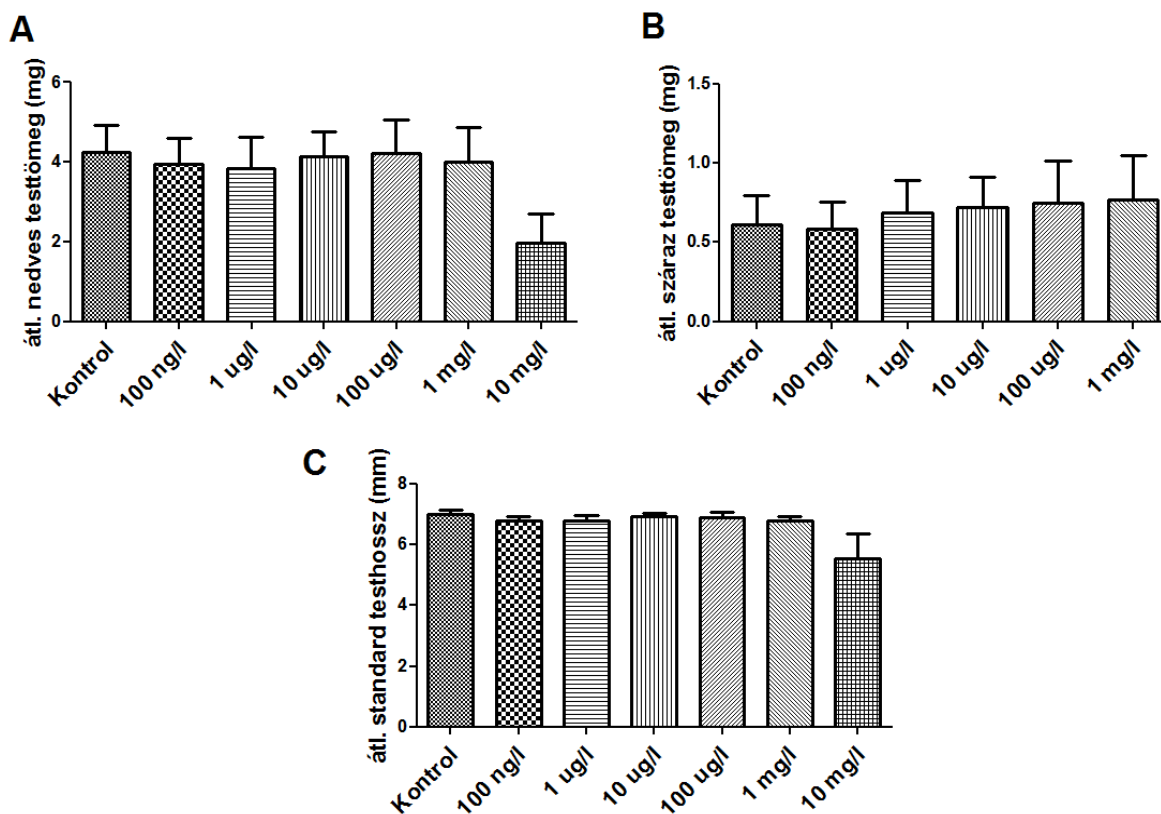
Az imatinib-bel kezelt zebradániók korai életszakaszában történő tesztelés során a halak mortalitása 36 és 47% között változott a kontrol és az 5 kisebb koncentráció között. Ezen csoportok között nem volt különbség a pusztulás tekintetében (18. ábra). A legnagyobb 10 mg/l-

es kezelésnél a mortalitás azonban már meghaladta a 90%-ot, ami már szignifikánsan különbözött (t-teszt, $p \leq 0,05$) a kontrol csoporttól. Így a mortalitás tekintetében a 10 mg/l-es koncentráció tekinthető LOEC értéknek.

A vizsgált testparaméterek egyikénél sem volt igazolható eltérés a kezelt és a kontrol csoport között (19. ábra).



18. ábra Az IM kezelt zebradániók korai életszakaszában megfigyelt elhullás eredményei. Az imatinib korai életszakasz vizsgálata során a halak mortalitása a kontrol csoporttól csak a legnagyobb, 10 mg/l-es kezelés esetében volt igazolhatóan különböző (t-teszt, $p \leq 0,05$).



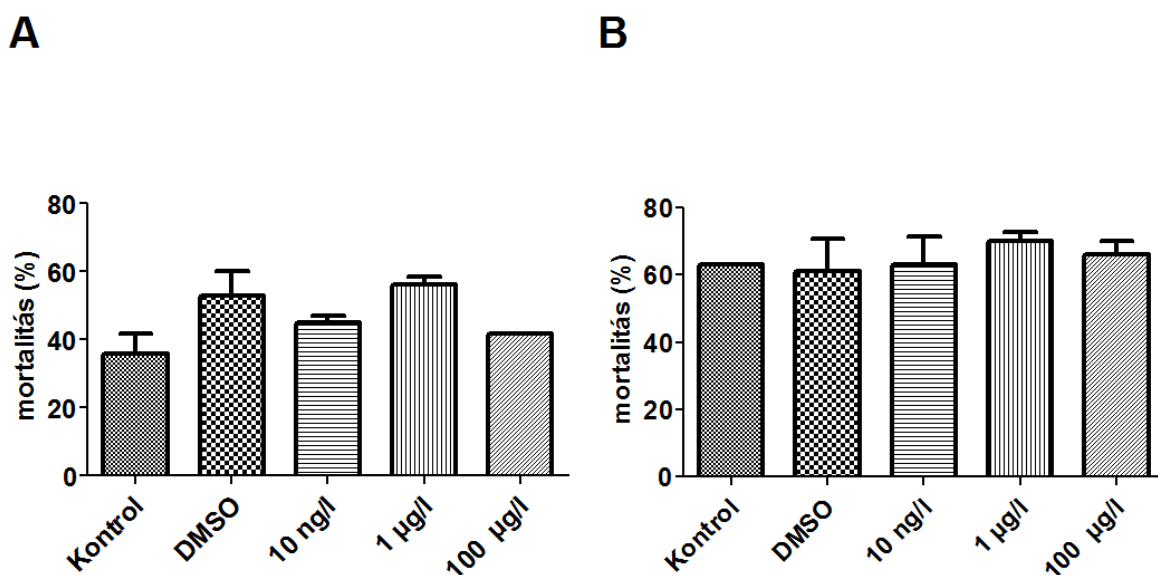
19. ábra Az IM korai életszakasz vizsgálat halainak testparaméter eredményei. Az imatinib vizsgálat során a 33 napos kezelés hatására egyik vizsgálati csoportban sem volt eltérés a sem a nedves (A), sem a száraz testtömeg (B), sem pedig a testhossz (C) tekintetében.

5.4 5-Fluorouracil többgenerációs vizsgálatának eredményei

5.4.1 Elhullás

Az F0 generáció kéthetes előkezelése során egy egyed sem pusztult el. Az F1 generáció esetében a korai életszakasz során (33 dpf) kiugró, 50%-ot meghaladó mortalitást a DMSO-val kezelt és az 1 µg/l tapasztaltunk (20. ábra), ez azonban nem volt statisztikailag igazolható a kontrol csoporthoz képest (35,75±8,13 %, Fisher exact test, p≤0,05). A magas mortalitás miatt ebből a két csoportból nem volt elég hal a testparaméterek leméréséhez a 33. nap végén. Az F1 generáció nevelése során a halak a korai életszakaszt (első 33 nap) követő időszak alatt pusztán a 100 µg/l csoportokban egy egyed elhullását figyeltem meg.

Az F2 generáció kezelésekor a vizsgálat 33 napja során minden csoport esetében magasabb mortalitást tapasztaltunk, mint az F1 generáció vizsgálatakor, azonban ez statisztikailag nem igazolható (20. ábra).



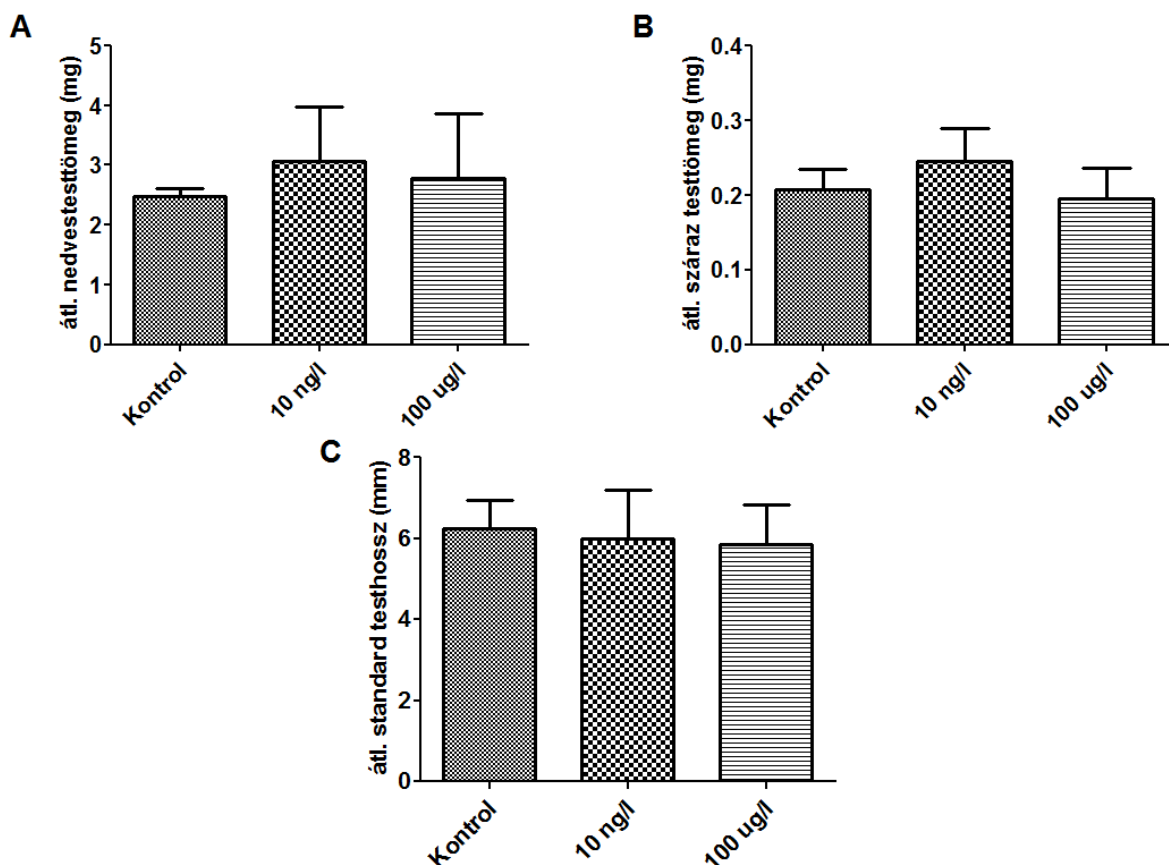
20. ábra Az 5-FU-val kezelt halak F1 és F2 generációjának mortalitása a halak életének első 33 napján. A két generációs vizsgálat alatt a halak korai életszakaszában nem volt különbség sem az F1 (A), sem pedig az F2 (B) generáció elhullási eredményeiben.

5.4.2 F1 fiatal halak testparamétereinek vizsgálata a termékenyülés utáni 33. napon

Az F1 egyedek esetében a termékenyülés utáni 33. napon végzett vizsgálat során az 5-FU-val kezelt fiatal halaknak sem a nedves, sem pedig a száraz testtömegében nem volt tapasztalható statisztikailag igazolható eltérés a kontrol csoporthoz képest. A kezelt csoportok esetében csak a 10 ng/l-es és a 100 µg/l, valamint a negatív kontrol csoport test paramétereinek vizsgálatához volt elegendő egyed a korai életszakasz periódus végén.

Látható volt, hogy a 100 µg/l-es kezelésnél a kontrolhoz (0,208±0,04 mg) képest a halak átlagos száraz testtömege (0,195±0,06 mg) alacsonyabb, míg a nedves testtömegük esetében a kontrolhoz (2,49±0,12 mg) képest magasabb volt az érték (2,79±1,1 mg).

Az egyes csoportok átlagos testhosszának összehasonlításakor nem volt tapasztalható eltérés a kontrol (6,24 mm±0,71 mm), valamint a 10 ng/l-es (6,01±1,19 mm) és a 100 µg/l-es (5,86±0,99 mm) kezelés között. Látható, hogy az egyes kezeléseknél a halak átlagos hossza csaknem megegyezett (21. ábra). A testhossz esetében az egyes kezelt csoporton belül nem voltak olyan jelentős a különbségek, mint a nedves testtömeg esetében.

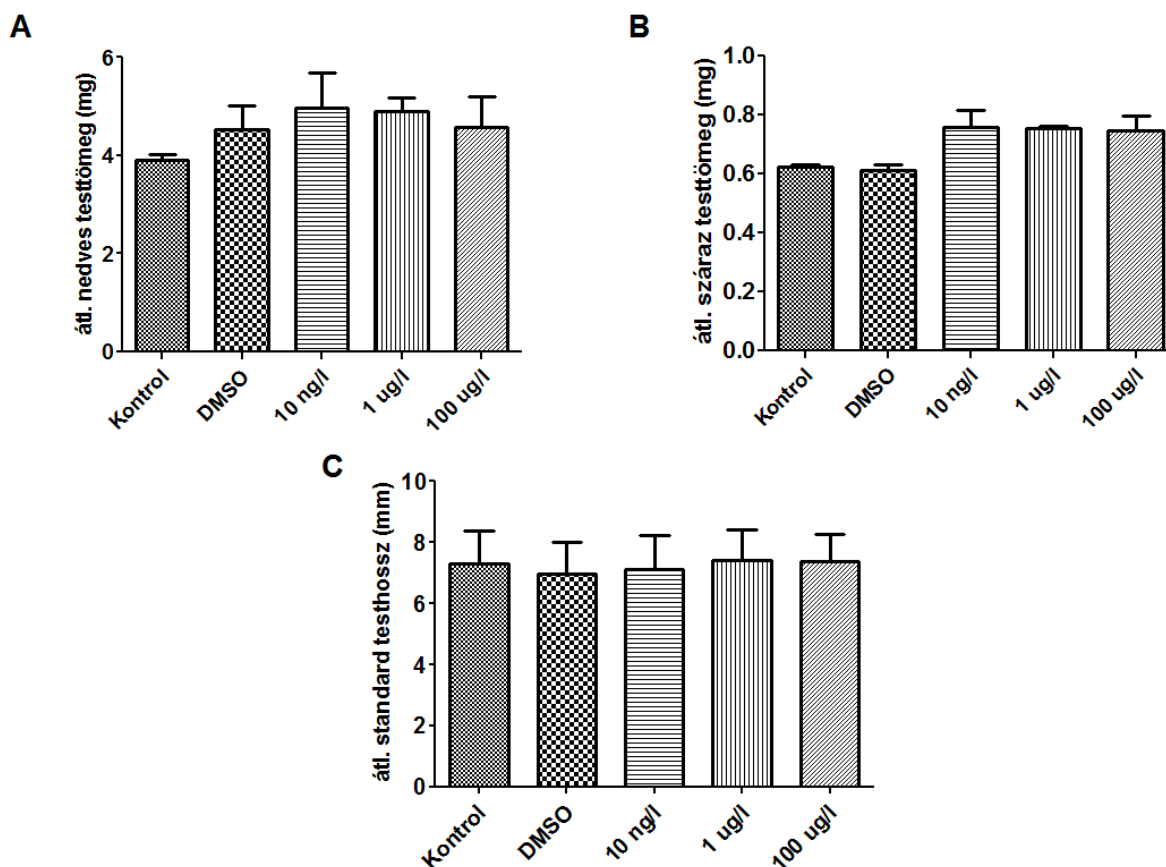


21. ábra Az 5-FU-val kezelt F1 generációs 33 napos halak testparamétereinek alakulása
Az F1 generáció korai életszakaszában a halak nedves- (A), száraz (B) testtömegének és standard testhosszának (C) eredményei alapján nem volt különbség az egyes csoportok között. A DMSO és az 1 µg/l-es csoport esetében nem volt elegendő hal a testparaméterek felvételéhez.

5.4.3 F2 fiatal halak testparamétereinek vizsgálata a termékenyülés utáni 33. napon

Hasonlóan az F1 egyedeknél kapott eredményekhez, az F2 generáció fiatal halainál sem volt statisztikailag igazolható ($p \leq 0,05$) különbség a kontrol és a kezelt csoportok, illetve a DMSO-val kezelt (oldószeres kontrol) csoport nedves és száraz testtömeg eredményei között.

Az F2 generációba tartozó fiatal halak testhosszának esetében nem volt tapasztalható statisztikailag igazolható különbség ($p \leq 0,05$) az egyes csoportok között. Itt is látható volt, hogy az átlagos testhosszok csaknem megegyeztek (22. ábra).



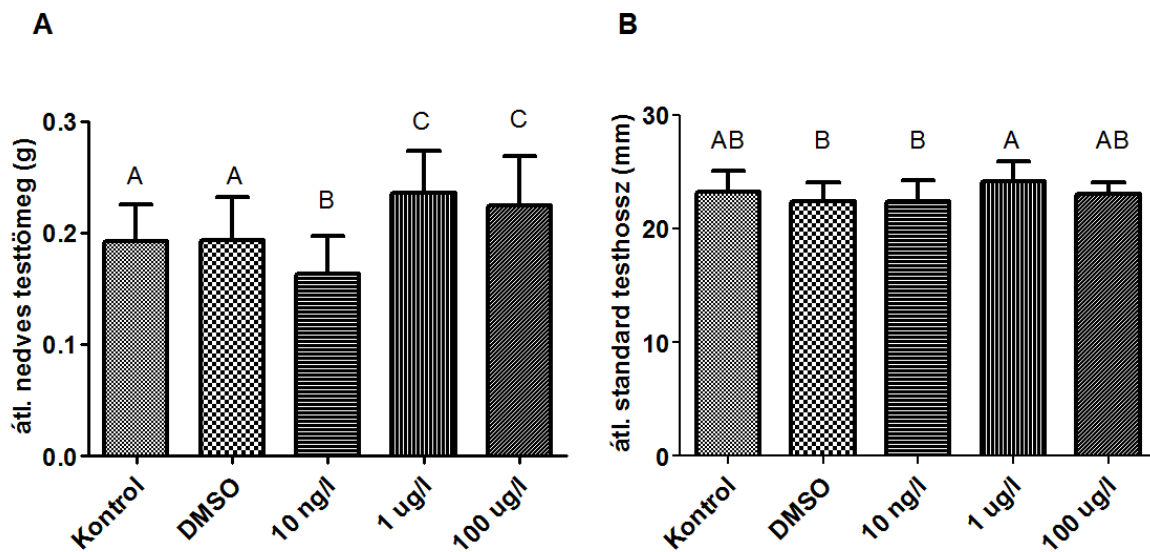
22. ábra Az 5-FU-val kezelt F2 generációs 33 napos halak testparamétereinek alakulása. Az 5-FU vizsgálata során nem volt különbség az F2 generáció halaink nedves- (A), száraz (B) testtömeg, illetve a standard testhossz (C) eredményei között.

5.4.4 F1 adult halak testparamétereinek vizsgálata hét hónappal a termékenyülés után

Az F1 generáció vizsgálata a halak hét hónapos korában fejeződött be. Az állatok túlaltatását követően vettük fel testparamétereiket. A nedves testtömeg vizsgálatakor a kontrol ($0,195 \pm 0,032$ mg) és a DMSO-val ($0,194 \pm 0,039$ mg) kezelt csoport között nem volt kimutatható különbség. A 10 ng/l-es kezelés ($0,163 \pm 0,034$ mg) esetében a halak átlagos testtömege azonban igazolhatóan alacsonyabb volt a kontrol csoportnál (ANOVA, Tukey post hoc teszt, $p \leq 0,05$). A két magasabb koncentrációjú oldattal kezelt halaknál ezzel ellentétes hatást tapasztaltunk. Mind az 1 µg/l-es ($0,235 \pm 0,038$ mg), mind pedig a 100 µg/l-es kezeléskor a halak átlagos testtömege szignifikánsan nagyobb volt (23. ábra) a kontrol csoportnál (ANOVA, Tukey post hoc teszt, $p \leq 0,05$).

A felnőtt egyedek átlagos testhosszának vizsgálatakor szintén nem találtuk különbséget a kontrol csoport ($23,2 \pm 1,89$ mm) és a DMSO-val kezelt ($22,43 \pm 1,6$ mm) csoport között (23. ábra).

Egyedül az 1 µg/l-es (24,14±1,73 mm) kezelésnél volt megfigyelhető igazolható eltérés a DMSO-val kezelt csoporthoz képest (ANOVA, Tukey post hoc teszt, $p \leq 0,05$).



23. ábra Az 5-FU-val kezelt F1 generációs 7 hónapos felnőtt halak testparamétereinek alakulása. A felnőtt F1 egyedek testparamétereinek összehasonlítása során mind a testtömeg (A), mind a standard testhossz esetében különbség volt tapasztalható. A testtömeg vizsgálatokor a kontrol csoportokétól minden kezelt csoport halainak tömege szignifikánsan eltért, míg testhossz esetében ez csak a DMSO és az 1 µg/l kezelésnél volt megfigyelhető. (ANOVA, Tukey post hoc teszt, $p \leq 0,05$).

5.4.5 Szaporodásbiológiai vizsgálatok

A felnőtt és már ivarérett F1 egyedek szaporítása 5 héten át zajlott. A lerakott ikraszámot a termékenyült és nem termékenyült ikraszemek esetében is normalizáltam az ívásban résztvevő halak számára. A 4. szaporítás alkalmával minden csoport esetében jelentős visszaesés volt tapasztalható a lerakott ikraszám mennyiségében, mivel ez torzította volna eredményeinket, ezért ezen eredményeket az elemzésből kihagytam. A négy szaporítás eredményeinek vizsgálatokor nem volt szignifikáns különbség az egyes kezelések között az ikra mennyiségének és a termékenyült, illetve a nem termékenyült ikraszemek számának tekintetében. Az 5. szaporítás során tapasztaltam csupán szignifikánsan több nem termékenyült ikraszemet az 1 µg/l csoportban a kontrolhoz képest a lerakott ikraszemek számában (Kruskal-Wallis, Dunns teszt, $p \leq 0,05$). A többi csoport esetében nem volt tapasztalható ilyen eltérés (M2 1. táblázat).

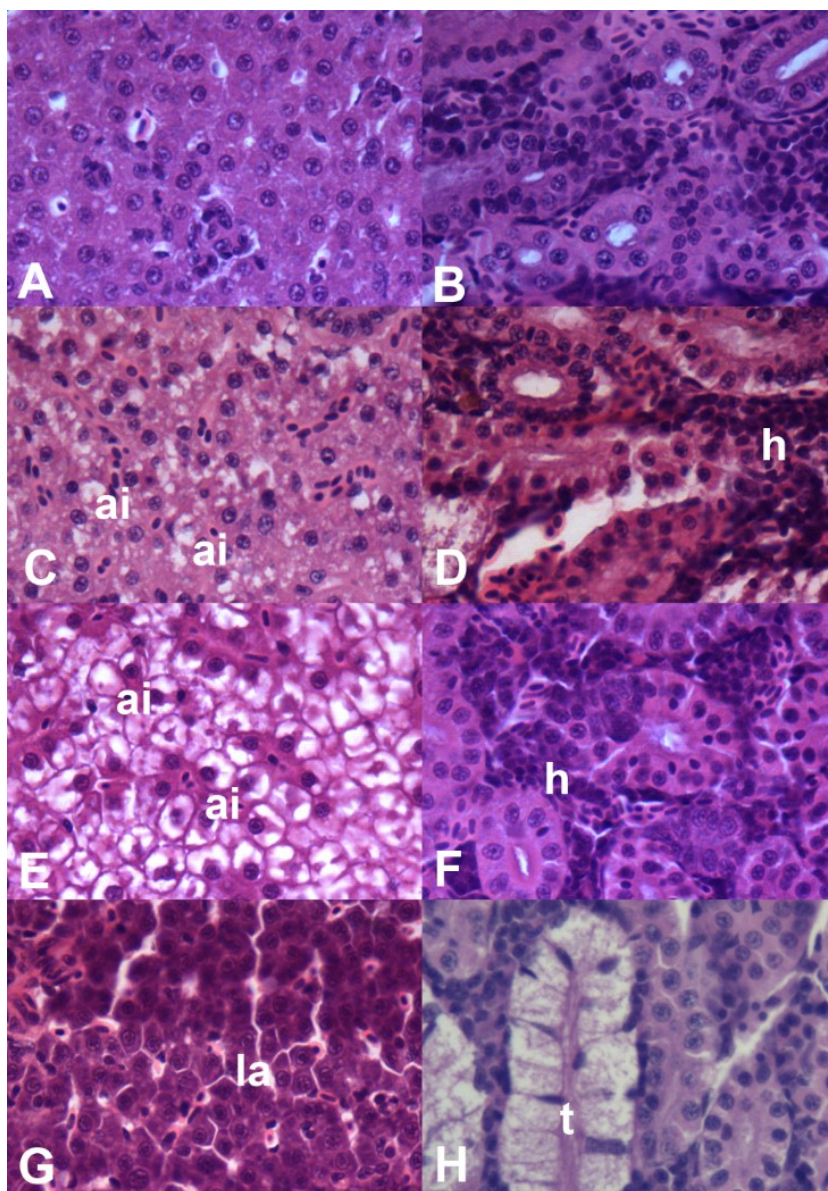
A halak ivararányának alakulásában nem volt tapasztalható eltolódás egyik kezelési csoportnál sem.

5.4.6 F1 adult egyedek szövettani vizsgálata

A nyálkasejtek számának megszorodása volt látható a kültakaróban a DMSO-val, illetve az 1 és 100 µg/l 5-FU -lal kezelt halak esetében. Bár a 10 ng/l-es kezelés esetében is 1 µl dimetilszulfoxid volt literenként a kezelő oldatban, itt mégsem volt megfigyelhető a nyálkasejtek számának növekedése. A DMSO-val kezelt pozitív kontrol egyedeknél megfigyelhető volt a kopolyú hámsejtjeinek proliferációja.

A 10 ng/l 5-FU-val kezelt állatoknál a máj zsíros infiltrációja (lipidosis) volt megfigyelhető. Már itt, a legkisebb kezelési koncentráció esetében is a hosszú távú kitettség hatására a máj regresszív elváltozása volt látható (sorvadás). Az 1 µg/l és 100 µg/l-es kezeléseknél is zsírlerakódás jelent meg a májban. Emellett a legnagyobb koncentráció esetében a máj szövetének sorvadása (máj atrophia) is látható volt némely egyednél (24. ábra).

Az oldószeres kontrol csoport esetében egy egyednél a vesetubulusok hámjának degenerációja volt megfigyelhető (*tubulonephrosis*). A 10 ng/l-es és az 1 µg/l-es 5-FU oldattal kezelt halaknál látható volt a vese vérképző szövetének enyhe hiperpláziája. A 100 µg/l-es csoportnál ezzel szemben a vérképző szövet regresszív elváltozásai jelentek meg (atrophia, sorvadás, depleció). Szintén a legnagyobb koncentrációval kezelt csoport egy egyedénél a vese tubulusok sorvadása, illetve tubulonephrosis volt felfedezhető (24. ábra).



24. ábra Az 5-FU-val kezelt F1 adult egyedek szöveteiben megfigyelt elváltozások
 A kontrol csoport esetében a májban (A 40x) és a vesében (B 40x) nem voltak megfigyelhetőek szövettani elváltozások. A 10 ng/l-es és a 1 µg/l-es kezelés esetében a halak máján (C 40x, E 40x) kismértékű zsíros infiltráció volt megfigyelhető, a vese (D 40x, F 40x) esetében pedig a vérképző szövet enyhe hiperpláziája volt látható. A 100 µg/l-es 5-FU kezelés után, a 7. hónap végére több egyednél is a máj atrófiáját (G 40x) figyeltem meg. Ezen kezelésnél a vese esetében tubulonephrosis volt látható (H 40x).

5.5 *Imatinib mesylate* több generációs vizsgálatának eredményei

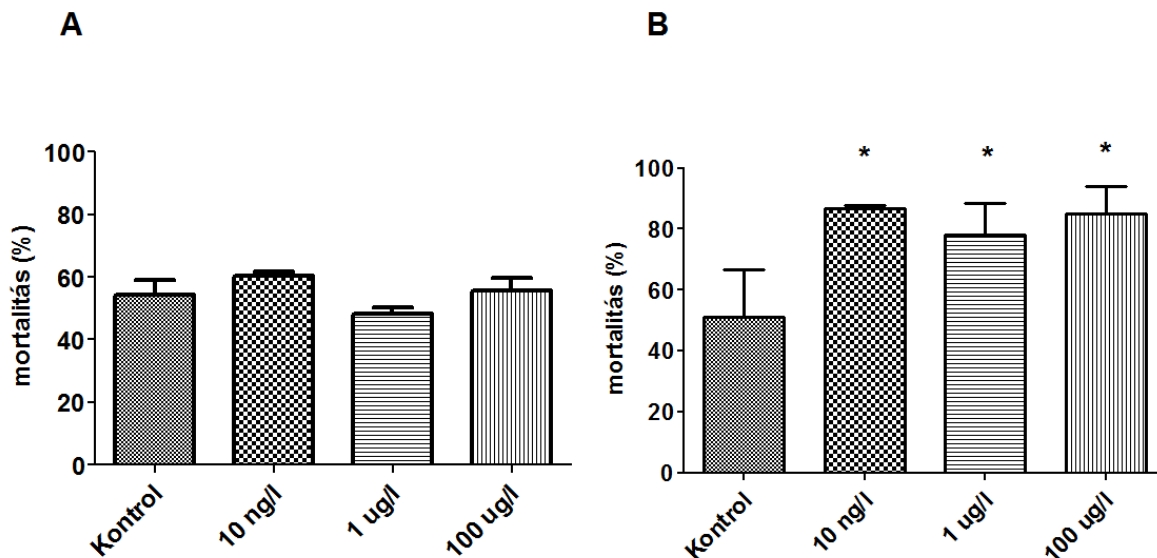
5.5.1 Elhullás

Az imatinib esetében sem volt pusztulás az F0 generációs kezelésében. Az F1 generáció korai szakaszában, a termékenyülését követő 33. napig tapasztalt mortalitás a kezelt csoportok esetében alig tért el a kontrol csoportban (54,17±4,95 %) tapasztalt elhullástól (25. ábra).

Az F2 generáció korai élet szakaszában azonban volt igazolható különbség a kezelt és a kontrol csoport (51±15,56 %) elhullásában. Mind a 10 ng/l- es (86,67±0,94 %), mind a 1 µg/l-es (78±10,37 %), mind pedig a 100 µg/l-es (85±8,96 %) kezeléseknél az elhullás szignifikánsan

magasabb volt (Fisher exact test, $p \leq 0,05$). Bár látható volt az F1 és a F2 generáció kezelt csoportjai között növekedés az elhullásban, azonban ez nem volt statisztikailag igazolható.

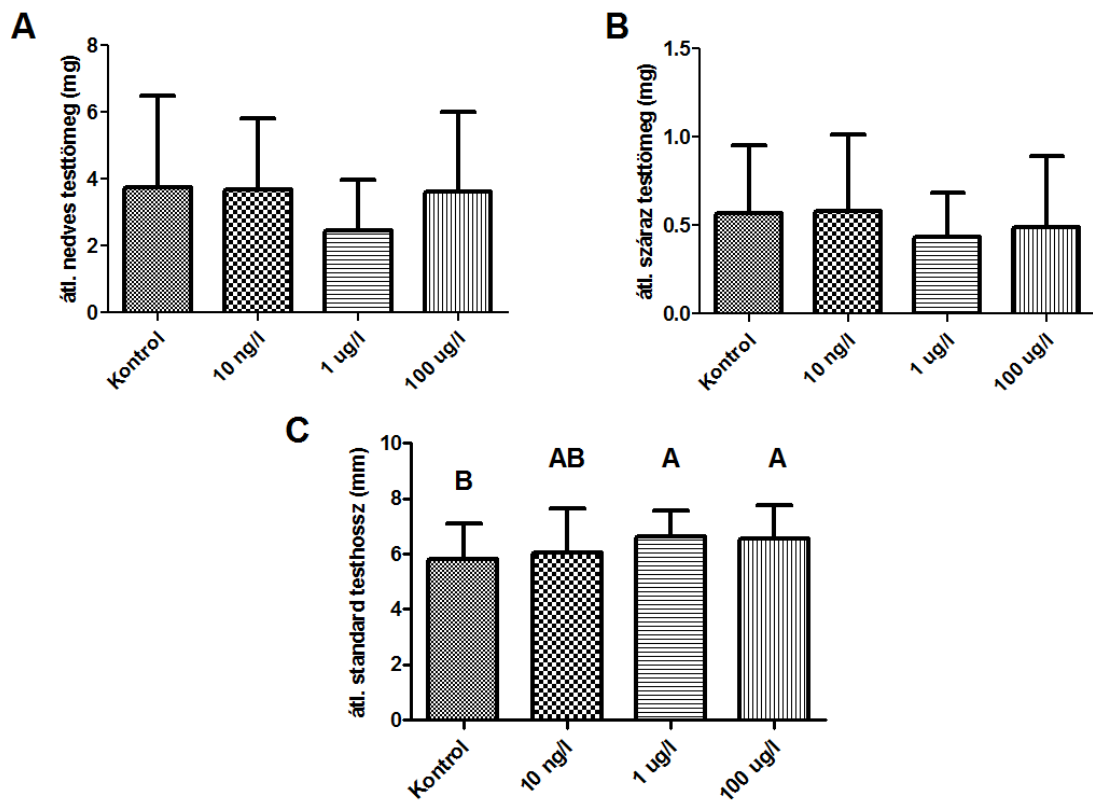
Az F1 generáció felnevelése során a halak korai életszakasza után nem volt elhullás a kontrol és a kezelt csoportokban sem (25. ábra).



25. ábra Az imatinib-bel kezelt F1 és F2 fiatal halak korai életszakaszában megfigyelt elhullás alakulása A vizsgálat során az F1 (A) és az F2 (B) generáció korai életszakaszában volt tapasztalható jelentősebb elhullás. Az F2 generáció esetében minden csoport esetében elhullás mértéke szignifikánsan nagyobb a kontrolhoz képest (Fisher exact test, $p \leq 0,05$).

5.5.2 F1 fiatal halak testparamétereinek vizsgálata a termékenyülés utáni 33. napon

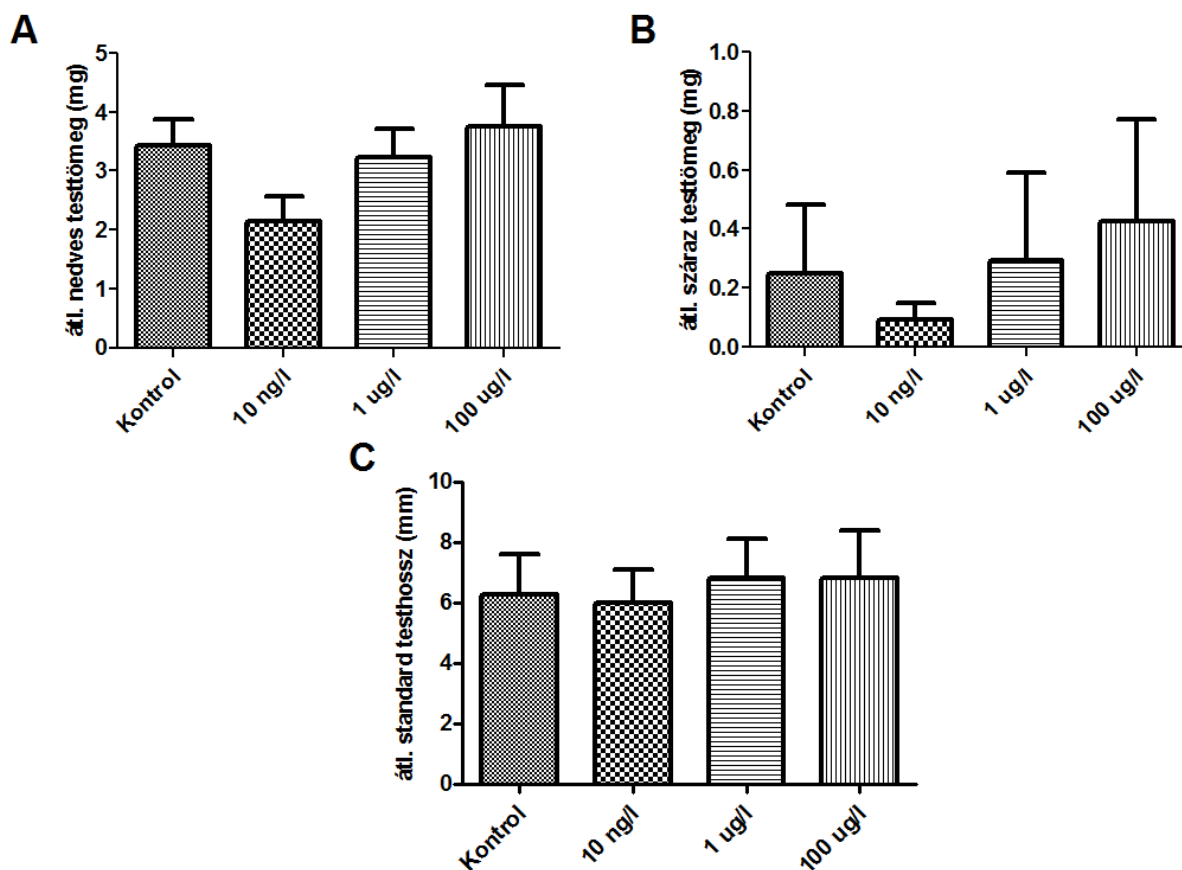
Az F1 generáció életének első 33 napjáig a nedves és a száraz testtömeg mérések esetében nem volt kimutatható különbség a kontrol és az IM-el kezelt csoportok között (26. ábra). A standard testhosszok összehasonlításakor azonban látható volt, hogy az 1 ($6,62 \pm 0,93$ mm) és a 100 $\mu\text{g/l}$ -es ($6,53 \pm 1,21$ mm) csoportokban a halak szignifikánsabb hosszabbak voltak a kontrol ($5,80 \pm 1,30$ mm) csoport egyedeinél (Kruskal-Wallis teszt, $p \leq 0,05$).



26. ábra Az imatinib-bel kezelt F1 egyedek testparamétereinek alakulása 33 nappal a termékenyülés után. Az IM-el kezelt egyedek F1 generációjának korai életszakasza során a nedves (A) és a száraz (B) testtömeg vizsgálata során nem tapasztaltam eltérést a csoportok között. A halak standard testhosszának összehasonlításakor azonban a két nagyobb koncentrációban az egyedek szignifikánsan nagyobbak bizonyultak a kontrol egyedeknél (Kruskal-Wallis teszt, $p \leq 0,05$).

5.5.3 Az F2 generációba tartozó fiatal halak vizsgálata a termékenyülés utáni 33. napon

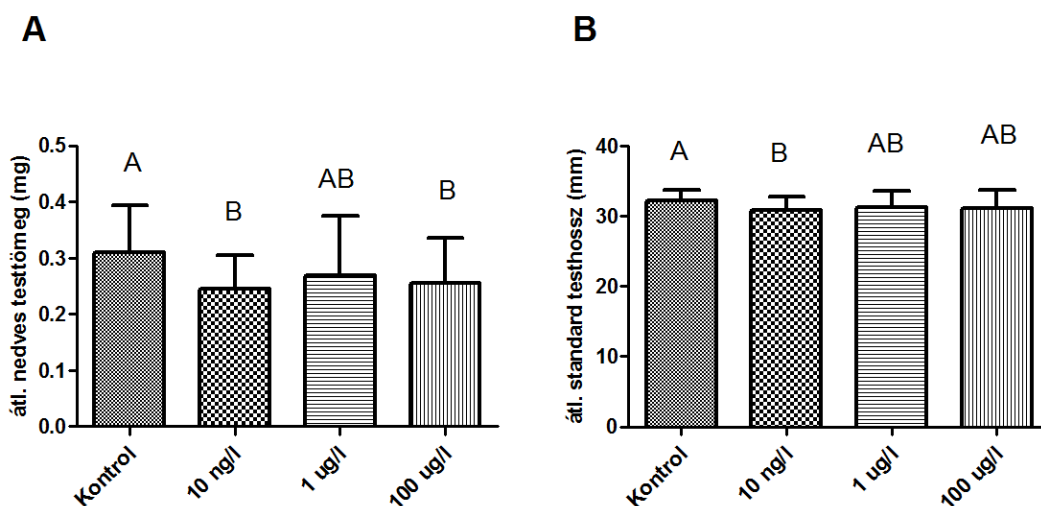
Az F2 generáció esetében, hasonlóan az F1-hez a testtömegek tekintetében nem volt tapasztalható eltérés a kezelt és a kontrol csoportok között (27. ábra). Az imatinibbel kezelt halak ezen generációjában, a testhossz tekintetében nem volt igazolható különbség az egyes csoportok között (Kruskal-Wallis teszt, $p \leq 0,05$).



27. ábra Az imatinib-bel kezelt F2 egyedek testparamétereinek alakulása 33 nappal a termékenyülés után. Az F2 generáció korai életszakaszában nem volt megfigyelhető eltérés a kontrol és a kezelt csoportok között sem a halak nedves- (A), sem a száraz (B) testtömegében, sem pedig a testhosszában (C).

5.5.4 F1 felnőtt halak testparamétereinek vizsgálata a 10 hónappal a termékenyülésük után

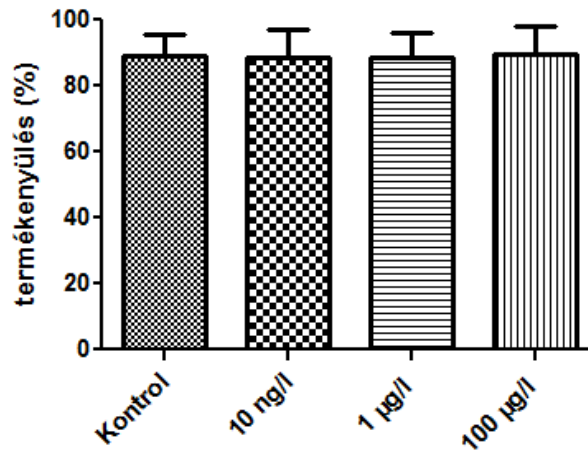
A F1 már felnőtt halak testparamétereinek felvétele minden kezelési csoport esetében 19-19 egyedben történt. A halak testtömegének összevetése során igazolható különbség volt felfedezhető a kontrol ($0,31 \pm 0,084$ g), a 10 ng/l-es ($0,245 \pm 0,061$ g) és a 100 µg/l-es ($0,255 \pm 0,081$ g) kezelések között (ANOVA, Tukey teszt, $p \leq 0,05$). A testhossz esetében azonban a csökkent testméret csak a legkisebb koncentrációnál ($30,85 \pm 1,98$ mm) volt statisztikailag igazolható (28. ábra). Bár az 1 µg/l-es ($31,23 \pm 2,37$ mm) és a 100 µg/l-es ($31,15 \pm 2,62$ mm) kezelések esetében is a halak testhossza kisebb volt, azonban ez nem bizonyult igazolhatóan különbözőnek a kontrolltól ($32,23 \pm 1,55$ mm, ANOVA, Tukey teszt, $p \leq 0,05$).



28. ábra Az imatinib-bel kezelt F1 felnőtt halak testparamétereinek alakulása
 A felnőtt F1 egyedek testparamétereinek vizsgálata során a testtömeg esetében (A) a legkisebb és a legnagyobb koncentráció esetében volt igazolható különbség, míg a testhossz tekintetében (B) csak a legkisebb koncentráció egyedei voltak igazolhatóan kisebbek (ANOVA, Tukey teszt, $p \leq 0,05$).

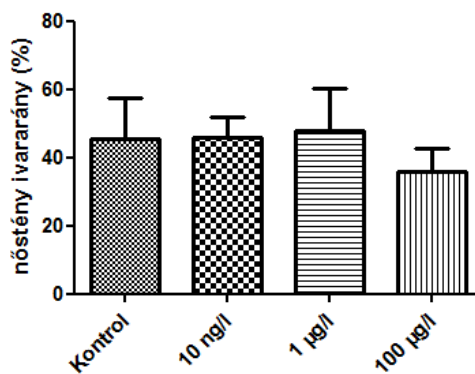
5.5.5 Szaporodásbiológiai vizsgálatok

Az imatinib esetében a halak szaporítását 6 hónapos korukban kezdtem meg és a szaporítások 9 héten át zajlottak. A lerakott ikraszámot a termékenyült és nem termékenyült ikraszemek esetében is normalizáltam az ívásban résztvevő halak számára, amely alapján látható volt, hogy bár a kontrol csoportokban a halak átlagosan több ikrát adtak kevesebb rossz ikraszemmel, azonban ez a különbség nem volt statisztikailag igazolható. A termékenyült ikraszemek száma egyedül az első szaporításban volt szignifikánsan több mint a 10 ng/l-es csoporté (Kruskal-Wallis teszt, $p \leq 0,05$). Az első három szaporítás alkalmával a kontrol csoport egyedei adták az egy anyára számított legtöbb termékenyült ikrát (M2 2. táblázat). A lerakott ikratermékenyülésének vizsgálatakor sem volt látható különbség a kontrol és a kezelt csoportok között. Minden vizsgálati csoport esetében a termékenyülés meghaladta a 80%-ot (29. ábra).



29. ábra Az imatinib-bel kezelt halak által adott ikratételek összesített termékenyülési aránya
A termékenyülés arány az F1 generáció különböző kezelési csoportjai esetében a teljes szaporítási
időszakra vonatkoztatva. Nem volt látható különbség a kezelt és a kontrol csoportok között.

A halak ivararányának vizsgálata során nem volt igazolható különbség az egyes csoportok között. A kontrol esetében a nőstények arány a 45,5%, a 10 ng/l-es csoport esetében 45,7%, a 1 µg/l csoport esetében 47,7%, míg a 100 µg/l kezelés esetében csupán 36% volt a nőstények arány a felnőtt halak között (30. ábra).



30. ábra A nőstények aránya az imatinib-bel kezelt F1 felnőtt egyedeknél
Az IM-el kezelt F1 generáció felnőtt halak ivar arányának vizsgálatakor nem volt igazolható különbség az
egyed kezelések között.

5.6 Új tudományos eredmények

1. Akut toxicitás tesztek segítségével elsőként határoztam meg a cisplatin és az imatinib mesylate fél-halálos koncentrációját zebradánió felnőtt egyedekre 96 órás expozíció mellett.
2. A vizsgált vegyületekkel akut toxicitás vizsgálatokat végeztem zebradánió embriókon, mely során leírtam az 5-fluorouracil szub-letális hatásait (lordozis, *fissura choroidea* rendellenesség). A cisplatin esetében meghatároztam a pusztulás dózis-hatás összefüggéseit, illetve azonosítottam az embriókon a kezelés szub-letális (kelés gátlás) tüneteit. Az etoposide vizsgálatkor szub-letális hatásként a következő elváltozásokat írtam le: farok hátsó szakaszának görbülése, szik és perikardiális ödémák. Az imatinib mesylate esetében dózis-hatás összefüggést figyeltem meg az elhullás tekintetében, illetve leírtam a kezelés szub-letális hatásait (farok pigmentációjának csökkenése, különböző szik torzulások és pigmentációs zavarok).
3. Elsőként vizsgáltam a cisplatin és az imatinib keverékének toxikus hatását hal embriókon. Eredményeim alapján a IM és CA prediktív módszerekkel becsült letalitás értékek jóval alacsonyabb toxicitást feltételeztek, mint ami a valós keverékekben megfigyelhető volt, ez szinergisztikus hatásra utal.
4. Az imatinib esetében elsőként vizsgáltam a vegyület szub-krónikus toxicitását zebradániók korai életszakaszában.
5. Megállapítottam, hogy a zebradániók 5-fluorouracilnak való több generációs kitettsége, igazolhatóan befolyásolta az F1 generációban a felnőtt halak testhosszát.
6. Az imatinib több generációs vizsgálata során megállapítottam, hogy szignifikánsan magasabb volt az F2 generációban a halak mortalitása a 10 ng/l, 1 µg/l és a 100 µg/l koncentrációkban is a kontrolhoz képest. Emellett a 10 ng/l-es koncentrációban az F1 felnőtt halak testhossza és testtömege igazolhatóan kisebb, míg a 100 µg/l-es koncentrációban a halak testhossza ugyancsak igazolhatóan kisebb volt a kontrol halakéhoz viszonyítva.
7. Kidolgoztam egy több generációs vizsgálati módszert, mely nem csupán a szaporodásbiológiai hatások tanulmányozására alkalmas. A módszer lehetőséget nyújt az F1 és az F2 generációk esetében a fiatal halak fejlődésének nyomonkövetésére, illetve a nagyobb egyedszám miatt egyéb biológiai végpontok (pl. genotoxicitás) mérésére is.

6. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

6.1 Következtetések

A különböző gyógyszerhatóanyagok, ezen belül is az antineoplasztikus vegyületek vízi szervezetekre gyakorolt akut és krónikus hatásairól igen kevés ismeret áll rendelkezésre. Bár ezen vegyületeket már évtizedek óta használják a klinikai gyakorlatban, csak az utóbbi egy-két évtizedben kezdtek el foglalkozni az alkalmazásukból fakadó környezetvédelmi kockázatokkal és a felmerülő veszélyekkel (Johnson et al. 2008).

Az élővizekbe kerülő xenobiotikumok „biológiai hasznosíthatóságát” (*bioavailability*) és biológiai hozzáférhetőségét (*bioaccessibility*) alapvetően meghatározzák azok fizikai-kémiai tulajdonságai. Számos, a kemoterápiás kezelések során használt farmakon poláros és így vízoldható, ezért mind a kórházak által kibocsátott, mind a kommunális szennyvizek tartalmazhatnak ilyen vegyületeket oldott formában.

Az egyes anyagok biológiai hasznosíthatósága és hozzáférhetősége jelenleg nem képezi kiemelt részét a kockázatbecslési tanulmányoknak, elsősorban a környezeti koncentrációra alapozva becslik meg a kockázat mértékét (Caldwell et al. 2014). Az általam vizsgált anyagok közül az 5-FU, a CisP és az ET mobilitása vizes környezetben viszonylag nagy ($K_{ow} < 1$). Emellett az 5-FU a legnagyobb mennyiségben használt antineoplasztikus hatású anyag világviszonylatban is (Kosjek et al. 2013), ezért feltételezhetően az 5-fluorouracil, valamint metabolitjai juthatnak ki a legnagyobb mennyiségben a környezetbe. Az 5-FU, a CisP és az ET klinikai alkalmazásakor gyakori a más hatóanyagokkal történő kombinált terápia, ugyanakkor az IM esetében elsősorban az önálló alkalmazás terjedt el (Kümmerer 2009a, Besse et al. 2012). Ezen anyagok az elfolyó szenny- és a felszíni vizekben már keverékként jelennek meg. A lehetséges hatásaik becslése nem könnyű feladat, melyet környezeti és helyi tényezők tovább nehezítenek (Toolaram et al. 2014). A vizsgált antineoplasztikus vegyületek vízi szervezetekre gyakorolt hatásáról, különösen krónikus kitétség esetén, nagyon korlátozottak az ismereteink (Brezovsek et al. 2014, Parrella et al. 2014b). Az 5-FU-nál és a CisP-nál nem zárható ki a hosszú távú kitétségből fakadó kockázat, hiszen a kórházi elfolyó szennyvizekben mért koncentrációk az eddigi vizsgálatokban 5-FU esetében 5 ng/l és 124 µg/l, míg CisP esetében 2-250 µg/l között változott (Mahnik et al. 2004, Lenz et al. 2007, Mahnik et al. 2007, Kovalova et al. 2009, Kosjek et al. 2013). Ezen vegyületek keverékeivel végzett vizsgálatok alapján (Parrella et al. 2014a, Kundi et al. 2015) az IM és az ET jóval kisebb környezeti kockázatot jelent, melynek oka részben az ET alacsony környezetben kimutatott koncentrációja (42 ng/l kórházi elfolyókban) (Yin et al. 2010). Az IM-nél azonban mégsem lehet teljesen kizárni a környezeti kockázat lehetőségét, mivel a vegyület kémia és fizikai tulajdonságai alapján ($K_{ow} > 3$) abszorbeálhat az iszapban és kötődhet a vízben lévő

szerves molekulákhoz, mely növeli a biakkumuláció és a biomagnifikáció esélyét (Xie 2012). További kockázatot jelent, hogy az IM az egyik legnagyobb mennyiségben felhasznált antineoplasztikus vegyület, melynek felhasználása sajnos folyamatosan növekszik és szinte semmilyen információval nem rendelkezünk a környezeti hatásáról és a viselkedéséről vizes közegben (Toolaram et al. 2014). A becsült környezeti koncentrációja az IM-nek és az 5-FU-nak elfolyó szennyvizekben 4,6 ng/l és 8,9 ng/l, míg felszíni vizekben 0,5 ng/l és 0,9 ng/l (Booker et al. 2014). Jelen tudásunk alapján nagyon nehéz megítélni az általam vizsgált vegyületek lehetséges környezeti kockázatát, melyhez remélhetőleg vizsgálataim eredményei a jövőben segítséget nyújtanak majd.

6.2 Akut vizsgálatok

6.2.1 Felnőtt halakon végzett vizsgálatok

A felnőtt halakon végzett OECD 203 (OECD 1992a) teszt alapján, az 5-FU toxicitása alacsonynak bizonyult (3. kategória - slightly toxic – alig toxikus, (EPA 2004)), hiszen 100 mg/l-es koncentráció esetében a limit teszt során sem tapasztaltam elhullást a vizsgálati csoportokban. A zebradániótól eltérő környezeti igényű, szivárványos pisztráng esetében is hasonlóan alacsony toxicitást (NOEC 1000mg/l) tapasztaltak 48 órás expozíció után (Gröner 1983). Az 5-FU-hoz hasonlóan, nem tapasztaltam elhullást az etoposide esetében sem a limit teszt során. A vizsgált négy antineoplasztikus vegyület közül a cisplatin bizonyult a legtoxikusabbnak felnőtt zebradániókon. Míg az imatinib esetében 70,8 mg/l volt 96 órás expozíció mellett a fél halálos koncentráció, addig a cisplatin LC_{50} értéke 64,5 mg/l volt ugyanilyen kitétség mellett. A CisP és az IM tesztelése során nem tapasztaltam semmilyen makroszkópos szub-letális hatást a kezelt egyedeken. A fenti vizsgálatok alapján ezért megállapítható volt, hogy a CisP és az IM a számított LC_{50} alapján mérésenként toxikusnak (2. kategória – moderately toxic - mérsékelten toxikus (EPA 2004) tekinthető felnőtt halakra. Felnőtt halak esetében ennél a két vegyületnél nincs irodalmi adat az akut toxicitás mértékéről.

A kapott eredmények alapján megállapítható, hogy a vizsgált négy vegyület toxicitása alacsony felnőtt halakon, így az ismert környezeti koncentráció tartományokban nem kell tartani akut mérgezés megjelenésétől. Az alacsony toxicitás oka vélhetően a molekulák gyenge felszívódása, illetve rövid felezési ideje. Emellett pedig a vízben található POC (Particular Organic Carbon) és DOC (Dissolved Organic Carbon) vegyületekhez kötődhetnek elsősorban az apoláros molekulák, így csökkentve tovább a felvehető szabad molekulák mennyiségét.

6.2.2 Halembrió toxicitás tesztek (FET)

Az 5-FU esetében embrionális korban vizsgált toxicitás során 72 órás expozíció mellett a számított LC_{50} érték igen magas volt (2992 mg/l). A módosított FET tesztben még 120 órás expozíciót alkalmazva is 2222 mg/l volt az 5-FU LC_{50} értéke. Hasonlóan alacsony toxicitást tapasztaltak DeYoung et al. (1996). Tűzcsele vizsgálata során is 120 órás kitettség esetén az LC_{50} érték 2420 mg/l volt. Afrikai karmosbéka békafajon különböző laboratóriumokban végzett vizsgálatok eredményei elég eltérő LC_{50} értékeket határoztak meg, melyek a 96 órás FETAX teszt során 310 és 2130 mg/l voltak (Gaudet- Hull et al. 1994). Ugyanezen a békafajon 120 órás FETAX teszt során DeYoung et al. (1996) 530 mg/l-ben határozta meg az LC_{50} értéket. Egy harmadik tanulmányban pedig ugyancsak 96 órás kitettség mellett a karmos béka embriókra számított LC_{50} érték 1220 és 1620 mg/l között változott (Dawson és Bantle 1987). Ezek alapján látható, hogy a vizsgálataimhoz hasonló, az 5-FU alacsony toxicitását figyelték meg az elhullás tekintetében más vízi szervezeteken is. 96 órás expozíció esetén *Xenopus* fajon végzett FETAX teszt EC_{50} értéke 120-137 mg/l (Dawson és Bantle 1987), míg 120 órás expozíció esetén 80 mg/l (Bantle et al. 1994) volt. Saját vizsgálatomban 72 órás expozíció esetén tapasztalt torzulások EC_{50} értékéhez ezen eredményekhez képest (1249 mg/l) jóval alacsonyabb toxicitást mutatott. Ezek a torzulások mindkét faj esetében elsősorban a gerinc deformitásai és különböző ödémák formájában mutatkoztak meg. Smith et al. (1983) vizsgálataikban beszámoltak az 5-FU erős teratogén hatásáról ember (*Homo sapiens*), egér (*Mus musculus*), patkány és házi tyúk (*Gallus gallus domesticus*) esetében is. A fenti fajokon végzett vizsgálatok során is elsősorban vázrendszert érintő torzulások jelentek meg a kezelt egyedeken. Az emlősökön megfigyelt erős teratogén hatása miatt az 5-FU példáján keresztül tesztelte Lau et al. (2000) a biológiai alapú dózis-hatás modellezés módszerének (BBDR, Biologically based dose-response modelling) alkalmazhatóságát a humán egészségi kockázatbecslésben. A vegyület embriófejlődésre gyakorolt erős toxikus hatásának négy fő okaként az alábbiakat jelölte meg:

(a) a thimidilát szintetáz gátlása, mely a thimidin tartalékok kimerüléséhez vezet, ami zavart okoz a dezoxinukleotid készletekben és ez a DNS szintézis, valamint a sejtciklus zavarához vezet; (b) direkt beépülés az RNS-be és ezzel funkció vesztett fehérjék szintézise; (c) a DNS direkt károsítása, amely a sejt halálához vezet; (d) a magzat májának károsítása, mely magzati anemiához vezethet (Shuey et al. 1994).

Bár a halakat elsősorban az ökotoxikológiai kockázatbecslésben használják a dózis-hatás összefüggés modellezésére, a zebra-dánió modell jól alkalmazható a különböző vegyületek teratológiai kockázatának értékeléséhez (Pang et al. 2002, MacRae és Peterson 2015), illetve eredményesen használható a tumor ellenes vegyületek korai fázisú pre-klinikai tesztelésére is (Zon és Le 2008).

Az 5-FU-nál jóval toxikusabbnak bizonyult az embriókon a cisplatin, melynek ototoxikus hatása zebradánió embriókon jól ismert (Ou et al. 2007). Vizsgálatom során jól látható volt az LC₅₀ érték csökkenése az expozíció hosszának előrehaladtával. Más, antineoplasztikus gyógyszerekre kiterjedő vizsgálatok során szintén a cisplatin akut toxicitása volt a legnagyobb *D. magna* modellen (Zounkova et al. 2007, Parrella et al. 2014b). A mortalitáson kívül, dózis hatás összefüggést találtam a koncentrációk és a lárvák kelési arányának csökkenése között. Míg a 120 órás expozíció esetében az LC₅₀ érték 81,3 mg/l volt, addig a 27,5 mg/l-es koncentrációnál az életben lévő lárvák 50%-a nem kelt ki. A csökkent kelés háttérében a cisplatin fent már említett ototoxikus hatása állhat (Ou et al. 2007). A halak oldalvonalában, illetve belső fülében található hallószőröcskék pusztulása negatívan befolyásolhatja a lárvák mozgáskoordinációját (Ou et al. 2007). A cisplatin zebradániók viselkedésére és mozgás aktivitására gyakorolt negatív hatásáról Kim et al. (2014) számoltak be munkájukban. 6 órás 1 mM-os cisplatin kezelés után már szignifikáns különbség volt kimutatható a halak által megtett teljes út (total swimming distance) és az átlagos úszási sebesség esetében. Valószínűsíthető, hogy az általam végzett vizsgálatban tapasztalt kelés gátlás is a halak csökkent mozgás aktivitásából következett. A zebradánió embriók kezelése során nem tapasztaltam torzulásokat. Ezzel szemben Peterka et al. (2002) házityúk tojásokkal történt vizsgálata során a CisP különböző elváltozásokat okozott a fejlődő embriókon. Patkány és egér modellen a cisplatin teratogén hatása különböző fejlődési rendellenességek és patológiai elváltozások kialakulásához vezetett a fejlődő embriókban (Keller és Aggarwal 1983, Hassan et al. 2016). A cisplatin antineoplasztikus hatását elsősorban közvetlenül a DNS-hez történő kötődése és az ezzel kialakuló DNS adduktok által fejt ki (Giurgiovich et al. 1997). A vegyület genotoxikus hatásáért és vélhetően teratogén hatásáért is a kiváltott oxidatív stressz a felelős (Sergi et al. 2004, Siddiqui et al. 2008). Az oxidatív szabadgyökök okozta sejtkárosodást támasztja alá, hogy szelén adagolása csökkentette a cisplatin toxikus hatását (Olas és Wachowicz 1996, Camargo et al. 2001).

Az etoposide embrionális toxicitása bizonyult az 5-FU mellett a legalacsonyabbnak a vizsgált anyagok közül. Más, halakon végzett vizsgálatokkal nem tudtam összehasonlítani az etoposide-on kapott eredményeket, ám különböző alacsonyabb rendű rákfajokon (*Crustacea*) végzett akut tesztekben hasonlóan alacsony toxicitást tapasztaltak más antineoplasztikus molekulákhoz képest (Zounkova et al. 2007, Parrella et al. 2014b). Az etoposide vizsgálatokor megfigyelhető volt a 300 mg/l-nél nagyobb koncentrációk esetében a vegyület kikristályosodása az oldószer ellenére is, már a vizsgálat második napján. Vizsgálatomban az LC₅₀ érték 96 órás és 120 órás expozíció esetében is 300 mg/l felett volt. Azonban az anyag ismeretlen mértékű kikristályosodása miatt, ebben a koncentráció tartományban az oldatban maradt mennyiség nem volt ismert. Az látható, hogy az etoposide akut embrionális toxicitása is igen kismértékű, bár a vizsgált

koncentrációkban megfigyelhető volt különböző embrionális elváltozások megjelenése. Egerek kezelése során Sieber et al. (1978) a nőtények többszöri intraperitoneális injektálása után az utódok fején és a gerincén különböző torzulásokat figyeltek meg. Az utódok agyszövetének hisztopatológias elváltozása volt látható nőtény egerek vemhesség alatti egyszeri intraperitoneális injektálását (4 mg/ttm kg) követően (Nam et al. 2006).

A felnőtt halakon tapasztaltakkal szemben a FET teszt során az imatinib bizonyult toxikusabbnak a cisplatin-nal szemben. Ebben az esetben is látható volt az expozíciós idő növekedésével a csökkenő LC₅₀ érték. Az egyes koncentrációknál különböző deformitások jelentek meg a fejlődő embriókon. Az imatinib magzati fejlődésre gyakorolt toxikus hatása jól ismert emlős modelleken. Az Gleevec® biztonsági dokumentációjában szereplő adatok alapján patkányok esetében 100 mg/ttm kg-os, vagy azt meghaladó mennyiségben (ez a 800 mg/nap humán maximális dózissal megegyező mennyiség) koponya csontok hiányát és agy fejlődési rendellenességeket (*anencephaly*) okozott (Novartis 2015). El Gendy et al. (2015) patkányokon végzett vizsgálatában végtag és a koponya deformitásokat figyelt meg vemhes patkányok kezelését követően az utódokon. Az imatinib kezelés megnövelte továbbá a vetélés kockázatát is. Sajnos az imatinib esetében sem állnak rendelkezésre összehasonlító akut vizsgálati eredmények halakon.

6.3 Keverékek vizsgálata

A cisplatin és az imatinib keverékeinek vizsgálata során látható volt, hogy a keverékek toxicitása jóval nagyobb volt, mint azt az egyes anyagok külön-külön történő tesztelése alapján várható lett volna. Az antineoplasztikus vegyületek vízi szervezetekre gyakorolt hatásával foglalkozó munkák közül több vizsgálat is foglalkozott az imatinib-bel és a cisplatin-nal, illetve ezen anyagok keverékeinek tanulmányozásával (Brezovsek et al. 2014, Parrella et al. 2014a, Kundi et al. 2015).

A *P. subcapitata* zöld alga, valamint *Synechococcus leopoldinensis* cianobaktérium fajokon végzett vizsgálatok során az egyes vegyületek keverékeinek hatását egyik faj esetében sem jelezte előre sem a CA sem pedig az IA predikciós modell (Brezovsek et al. 2014). Hasonlóan ehhez a vizsgálathoz, az általam tesztelt keverékeknél tapasztalt magas mortalitást sem jelezték előre az alkalmazott modellek. Vizsgálatomban ennek több oka is lehetett. Ezek a modellek elsősorban szub-letális hatások becslésére lettek kidolgozva, melyet alacsony koncentráció tartomány mellett lehet vizsgálni. Esetemben azonban magas koncentráció tartományban vizsgáltam a mortalitást, mely egy durva végpontnak minősül. Hasonlóan nem működött a keverékek hatásának becslése kobalt és réz esetében szivárványos pisztráng akut vizsgálatokor a mortalitás meghatározásában (Marr et al. 1998). Az addíciós modell viszont jól leírta tűzcsele esetében

alacsony koncentráció tartományban is az ösztrogén hatású vegyületek keverékének a vér vitellogenin szint növekedésére gyakorolt hatását (Brian et al. 2005). Ebben a vizsgálatban, valamint Thorpe et al. (2005) kísérleteiben is, olyan ösztrogén hatású vegyületeket teszteltek, melyek ugyanazon receptor útvonalon keresztül hatnak, tehát a hatás összeadódása egyértelmű, szemben az általam tesztelt gyógyszerekkel.

A kutatásaimban is vizsgált négy vegyület keverékeinek hatását tanulmányozta Parrella et al. (2014a) is *D. magna* és *C. dubia* fajokon. Vizsgálatuk során az IM és CisP keverékének esetében tapasztalták csak a *D. magna* reprodukciós vizsgálatokor, hogy a komponensek gátolták egymás hatását. A többi kombináció esetében ennél a fajnál a hatás minden esetben független volt. A *C. dubia* reprodukciós vizsgálata során ezzel szemben azt tapasztalták, hogy a keverék alkotói erősítették egymás hatását. Kundi et al. (2015) munkájukban az előbbi vizsgálatban is bemutatott két fajon végzett genotoxikológiai teszteket, szintén az előbbi vegyületek alkalmazásával. Eredményeik alapján az IM és a CisP a DNS töredezettségére egymástól függetlenül hatott. Azonban nem zárható ki eredményeik alapján a hatások összeadódása sem.

Eredményeim és az irodalmi adatok alapján úgy tűnik, hogy mivel a vizsgált citosztatikumok független molekuláris útvonalakon fejtik ki hatásukat, a két vegyület hatása független egymástól. Ez azonban nem jelenti azt, hogy a hatások nem adódhatnak össze és ne erősíthetnék egymást, mint ami a zebradánió embriók mortalitás adatain is jól látható volt. Ezt az interakciót nevezik heteroadditivitásnak (Katsnelson et al. 2011)

6.4 Korai életszakasz vizsgálatok

Két vegyület esetében végeztem szub-krónikus vizsgálatokat. Az 5-FU-nál, szemben az alacsony akut toxicitásával, a vizsgálatot az indokolta, hogy jelenleg ez a vegyület a leggyakrabban alkalmazott antineoplasztikus hatású gyógyszer a fejlett országokban (Besse et al. 2012). A másik krónikus tesztben is vizsgált vegyület az imatinib volt, melynél a legmagasabb mortalitást tapasztaltam az akut embrió vizsgálatok során. Mindkét vegyület tesztelése során igyekeztem olyan tesztkoncentrációkat választani, melyekkel modellezni lehetett az irodalomban megjelenő mért és becsült környezeti koncentrációkat (Fick et al. 2010, Straub 2010a, Besse et al. 2012, Kosjek et al. 2013, Negreira et al. 2013b).

Az 5-FU szub-krónikus vizsgálata során a fejlődő embriókon nem tapasztaltam deformitásokat a vizsgált koncentrációkban. A kezelés végére a mortalitás szignifikáns növekedése egyedül a 10 mg/l-es koncentrációban volt megfigyelhető (92±2,8%). Egy korábbi, szintén OECD 210 (OECD 1992b) protokoll alapján zebradánión végzett vizsgálatban 100 mg/l-es koncentrációnál tapasztaltak csak szignifikáns növekedést a mortalitásban és ugyancsak igazolható eltérést a halak testhosszában (Egeler és Seck 2009). A halak testhosszában, az 1 mg/l-es koncentrációnál

volt statisztikailag igazolható növekedés, míg Egeler és Seck (2009) csak a 100 mg/l-es koncentrációnál tapasztalta ugyanezt. Vizsgálatomban a 10 mg/l-es kezelésnél a nagymértékű elhullás miatt a medencében lecsökkent egyedsűrűség miatt nőhettek a halak nagyobbra, ezért ennek a kezelésnek a testparaméter eredményeit nem vettem figyelembe az értékelés során. Az 1 mg/l-es kezelésnél az elhullás azonban nem magyarázhatja a halak nagyobb testhosszát. A nedves és a száraz testtömeg esetében ez a növekedés nem volt igazolható. Eredményeim alapján úgy tűnik, hogy antimetabolikus hatású 5-FU 1 mg/l-es, hosszú távú kitettséggel a testnövekedésében is megfigyelhető módon avatkozott be az állatok fejlődésébe.

Az imatinib hosszú távú vizsgálata során csak a legnagyobb 10 mg/l-es kezelés esetében tapasztaltam a mortalitás szignifikáns mértékű növekedését. A halak testparamétereinek esetében nem volt látható eltérés a kontrol csoporthoz képest. A 10 mg/l-es kezelés esetében csak három egyed testparamétereit tudtam lemérni és ezen állatok kis testtömege nem tette lehetővé a száraz testtömeg mérését. A FET teszt során az IM bizonyult a legtoxikusabbnak, azonban még az 1 mg/l-es koncentráció tartományban 33 nap után sem volt látható hatása a kezelésnek.

Vízi szervezetekre vonatkozóan csupán az irodalomban fellelhető akut toxicitás tesztek alapján alkothatunk képet az IM toxicitásáról (Parrella et al. 2014b). Emlősök esetében is elsősorban az akut toxicitásra vonatkozóan találhatóak vizsgálati eredmények a gyártók biztonsági adatlapjain. Halak vonatkozásban nincs irodalmi adat az imatinib hosszú távú hatásairól az állatok növekedésére vagy a vegyület egyéb toxikus hatására. Rágcsálók esetében azonban 4 hetes korú Wistar patkányokon végzett 10 hetes kezelés dózis-hatás összefüggést mutatott a combcsont és a sípcsont hosszának csökkenésével és a csontos elemek szilárdsági mutatói is csökkentek (Tauer et al. 2015).

6.5 5-fluorouracil és cisplatin többgenerációs vizsgálatok

A két vegyület több generációs vizsgálat eredményeinek értékelését egyben kívánom bemutatni, mivel így az olvasó számára könnyebben átláthatóak és összevethetőek a két vegyület tesztelésekor kapott eredmények.

6.5.1 A mortalitás alakulása az F0, F1 és F2 generációkban

A több generációs vizsgálatokhoz kialakított protokoll kezdő lépése az F0 generáció előkezelése volt, mely mindkét teszt során azonos módon zajlott és egyik kísérletnél sem tapasztaltam elhullást. Az általam alkalmazott hossza ennek a kezelési periódusnak 2 hét volt. A szakirodalomban, az előkezelés hosszáról eltérő véleményeket találhatunk, melyet több tényező is befolyásolhat. Az F0 generációnak az előzetes kezelését az indokolja, hogy bizonyos

xenobiotikumok képesek a nőtény testéből az ivarsejtekbe kerülni. Ez elsősorban a vitellogenin transzport mellett zajló zsírok mobilizációjával megy végbe (Johnson 2009). A zsír depók mobilizációjának elsődleges célja mindkét ivarban az energia biztosítása az iváshoz (Jobling et al. 1997). Emellett a nőtényeknél fontos energia tartalékot biztosít a majdan fejlődő embriók számára is. A nagymértékű anyagforgalommal jelentős mennyiségben kerülhetnek, elsősorban lipofil vegyületek, a petefészekbe. Zebradánió esetében, hasonlóan a többi csontos halhoz a vitellogenezis intenzív szakasza a III. stádiumú oocytákban zajlik (Horváth 1980, Selman és Wallace 1989). A III. stádiumú oocyták aránya az aszinkron fejlődésű petefészekben folyamatosan 10-12%-os (Csenki 2011). Ezért folyamatos a mobilizált tápanyagok beépülése az ivarszervbe. Csenki (2011) munkája alapján szintén látható, hogy 2 hét elegendő, hogy a III. stádiumból érett ikra fejlődjön. Tehát az általam választott előkezelés hossza is elegendő volt ahhoz, hogy a vizsgált két vegyület bejusson a fejlődő petesejtekbe. Szivárványos pisztráng és sügér (*Perca fluviatilis*) vizsgálatokor, két héttel a kezelés megkezdését követően a felvett [¹⁴C]-2,2',5,5'-tetrachlorobiphenyl (log K_{ow}=6,34) több mint 30%-a a fejlődő petefészekben és herében felhalmozódott fel (Guiney et al. 1979, Vodcicnik és Peterson 1985). Egy másik vizsgálatban a trifluarin-nal (log K_{ow}=5) kezelt szivárványos pisztrángok már érett petesejtjeiben ezzel szemben nem volt mérhető a vegyület bejutása az intra-vaszkuláris injekció után (Schultz és Hayton 1997).

Az F1 generációk életének korai szakaszában mindkét vizsgálatban a halak körülbelül fele élt túl függetlenül attól, hogy kezelt vagy kontrol csoportban neveltem őket. Ettől csak az 5-FU esetében a DMSO és az 1 µg/l-es csoportnál volt némi eltérés. Az F2 generáció ugyanezen életszakaszában mind a fluorouracil-lal, mind az imatinib-bel kezelt csoportoknál az F1-nél nagyobb mértékű mortalitást tapasztaltam. Ez az imatinib esetében statisztikailag is alátámasztható volt mindhárom koncentrációnál. A magasabb mortalitás legvalószínűbb magyarázata a kezelés hatására fellépő vitalitás csökkenés, lévén, hogy az 5-FU antimetabolitként képes a sejtciklus S fázisába beavatkozni (Xie 2012) és ezzel zavarokat okozni a sejtek megújulásában. E mellett ismert a 5-FU genotoxikus hatása is hosszú távú kitétség esetén zebradánió modellen (Kovács et al. 2015), amely szintén csökkentheti az állatok vitalitását. Meg kell azonban jegyezni, hogy az 5-FU vizsgálatokor a kontrol csoportoknál is nőtt a mortalitás mértéke az F2 generációban, míg a csak DMSO-val kezelt csoportnál ez nem változott. Az IM kezelt egyedeknél tapasztalt pusztulásra több lehetséges magyarázat is adódik, mivel a tirozin kináz inhibitor hatását több útvonalon is kifejti (Kübler et al. 2005), azonban ennek a hosszútávú következményeiről kevés adat áll rendelkezésre. Több vizsgálatban is leírták a krónikus myeloid leukémiában és 2. típusú diabéteszben egyaránt szenvedő betegek esetében, hogy az imatinib sikeresen kezelte mindkét betegséget (Breccia et al. 2004, Veneri et al. 2005).

Tehát az imatinib befolyásolta mind az inzulin rezisztenciát, mind pedig a máj glükóz termelését. Ezt Hagerkvist et al. (2008) patkány kísérletekben is igazolta bizonyítva, hogy az imatinib alacsony dózisban adagolva csökkenti az inzulin rezisztenciát és kis mértékben a máj glükóz termelését is. Ez alapján elképzelhető, hogy az általam alkalmazott alacsony koncentráció mellett a kezelés megváltoztathatta a halakban a glükóz hasznosulását, ezzel pedig befolyásolhatta az állatok anyagcsere folyamatait, így a vitalitásukat és a növekedési erélyüket is.

A többgenerációs vizsgálatok esetében a halak korai életszakasza során megállapítható, hogy a halak túlélése az alkalmazott kezelési rendszerekben, a kontrol csoportokban sem haladta meg a 65%-ot. Hasonló magas mortalitásról számolt be Fassbender és Braunbeck (2013a) munkájában, ahol a magas mortalitás okának, esetükben a halak medencéből-medencébe történő áthelyezését, mozgatását jelölték meg. Vizsgálatomban, a mozgatással járó esetleges sérülések mellett a magasabb mortalitást az okozta, hogy a vizsgálatokba bevont halak száma az alkalmazott kísérleti beállítás (fél-statikus rendszer, kísérleti edények mérete) halnevelő képességének felső határát jelenti. Az alkalmazott módszerrel több hal felnevelése az adott rendszerben eredményesen nem lehetséges. A másodikként elvégzett, IM vizsgálatnál ezért is alkalmaztam 150-150 db embriót ismétlésenként az F1 generáció kezelésének kezdetén. A kiindulási egyedszámot egy ilyen, különösen hosszútávú vizsgálatnál nagyon nehéz meghatározni. Különösen, ha a halakat tovább is szeretnénk szaporítani. Ehhez minimum 100 embrió kezelésére van szükség az itt alkalmazott kísérleti beállítás mellett.

A vizsgálatok alapján megfigyeltem továbbá, hogy a fiatal halak életszakaszában a 14-16 dpf közötti időszak a legkritikusabb. Az általam alkalmazott nevelési hőmérsékleten, erre az időszakra tehető a szikhólyag teljes felszívódása (Parichy et al. 2009). Tehát az ezt követő periódusban a halak már csak az általuk felvett táplálékból nyerhetnek energiát. Tapasztalatom szerint, azok a halak, melyek erre az időszakra nem képesek az *Artemia* naupliuszokat elfogyasztani, nagyon kis valószínűséggel maradnak később életben, függetlenül attól, hogy a kezelt vagy a kontrol csoportból származnak.

6.5.2 F1 és az F2 egyedek testparamétereinek alakulása a halak korai életszakaszában

A halak testparamétereinek a korai életszakaszban történő meghatározása általában a többgenerációs vizsgálatnak nem képezi a részét. Annak ellenére, hogy a kezelés közben történő mérések, a mortalitás adatokon túl, fontos információval szolgálhatnak a halak fejlődéséről. Az általam alkalmazott módszerhez hasonlóan, Coimbra et al. (2015) a klofibrán savval etetett zebradániók testparamétereit is meghatározták a nevelés több időpontjában a több generációs vizsgálat során. Ugyanakkor más hosszútávú vizsgálatban, bár történt mintavétel a halak növekedés során, a testhosszt és a testtömeget mégsem mérték le (Sowers et al. 2009). Kim et al.

(2014) a benzofenon-3 medakán történt két generációs vizsgálata során az F1 generáció esetében mérte le a fiatal egyedek testparamétereit, mely egyik kezelési csoportban (15, 50, 150, 500 µg/l) sem mutatott eltérést a kontrol csoportoktól.

Vizsgálataim során a 33 dpf korú F1 halaknál, az 100 µg/l-es 5-FU-val kezelt csoportban az átlagos nedves testtömeg nagyobb, míg a száraz testtömeg kisebb volt a kontrol egyedekénél. Ezek alapján úgy tűnik, hogy ezen halak testének víztartalma magasabb volt. Ez az F2 generációnál már nem volt megfigyelhető. Ennél a generációnál a kezelt csoportok mindegyikében az átlagos nedves és száraz testtömeg nagyobb volt, mint a kontrol csoport halaié.

Az IM-el kezelt egyedek esetében az F1 generációban az 1 és a 100 µg/l-es csoportoknál a halak nedves és száraz testtömege egyaránt csökkent. Azonban az átlagos testhossz ez esetben is szignifikánsan nagyobb volt. Ez a tendencia az F2 generációban már nem volt látható. A két legnagyobb koncentráció esetében a halak testhossza nagyobb volt, ez azonban nem volt igazolható statisztikai módszerrel. Fontos kiemelni, hogy mindhárom csoport esetében jóval nagyobb mortalitás volt tapasztalható, mint a kontrol csoportban és ezért a kisebb egyedsűrűség miatt a halaknak nagyobbra kellett volna nőniük, hasonlóan, mint ahogyan az az 5-FU szubkrónikus vizsgálatában a 10 mg/l-es csoportnál látható is volt. Ezzel szemben, a 10 ng/l-es csoportnál a halak testtömege jóval alacsonyabb volt, mint a kontrol csoporté, míg a két nagyobb koncentráció esetében ez a paraméter szinte megegyezett a kontrol esetében megfigyelhető értékkel, vagy kissé meghaladta azt.

6.5.3 F1 felnőtt egyedek testparamétereinek alakulása

A felnőtt halak testparamétereinek meghatározása csaknem minden, az irodalomban megtalálható munkának fontos végpontja (Seki et al. 2003, Seki et al. 2004, Diekmann et al. 2004a, Fassbender és Braunbeck 2013a, Coimbra et al. 2015). Az 5-FU-val végzett vizsgálat során a felnőtt halak testtömegében minden kezelésnél szignifikáns különbség mutatkozott a kontrol csoporttól. Amíg a két nagyobb koncentrációnál a halak átlagos tömege kisebb volt, addig a 10 ng/l-es kezelés esetében ez a paraméter növekedést mutatott. A standard testhosszok vizsgálatakor ilyen jelentős különbség nem volt látható. Ha ezeket az eredményeket összehasonlítjuk a korai életszakaszok eredményeivel látható, hogy a két nagyobb koncentráció esetében minden vizsgálati végpontban a halak átlagos nedves tömege nagyobb volt a kontrol egyedekénél. Bár a 10 ng/l-es kezelésnél a fiatal egyedeknél is megfigyelhető volt ez a jelenség, azonban a felnőtt egyedek esetében a 7 hónapos kitettség pont az ellenkező hatást eredményezte. Az irodalomban hasonló példát a testparaméterek változására a benzo-pirén (BaP) kezelés hatására írták le zebadánió lárvákon. Ebben a vizsgálatban az F1 generáció fiatal egyedeinek

testhossza szignifikánsan kisebb volt a kezelt egyedeknél, míg a következő generációkban ez már nem volt megfigyelhető (Corrales et al. 2014). A magyarázat az 5-FU esetében a koncentráció tartományok (100, illetve 10000 szoros) közti különbségekben lehet. Ösztradiol esetében leírták, hogy 4-szeres koncentráció különbség adagolása esetén felnőtt hím egereknél a here relatív tömege a kisebb koncentrációban 30%-al nőtt, míg a nagyobb dózisonál a tömege csökkent (Vom Saal et al. 1997). A kapott eredmények alapján elképzelhetőnek tartom, hogy a nanogrammos koncentráció tartományban a kisebb mennyiségű, felvett 5-FU hatására más molekuláris és élettani folyamatok, illetve más intenzitással zajlottak le, mint a mikrogrammos tartományban.

Az IM esetében a felnőtt halak testtömege a kezelés hatására egyértelműen csökkent kisebb, vagy nagyobb mértékben. Ez a csökkent testméret ennél a vegyületnél igazolhatóan csak a 10 ng/l-es kezelésnél volt látható a testhossz tekintetében. A korai életszakaszokban mért eredményekkel ezt összevetve láthatunk némi különbséget. A rövidebb expozíciók esetében inkább a testhossz növekedése volt a jellemző a kezelt csoportokra, mintsem a csökkenés. A testtömegek esetében szintén a nagyobb koncentrációknál az F1 generációban a testtömeg inkább csökkent. Az F2 generációban a testtömegek tekintetében azonban a legkisebb koncentrációban a halak tömege egyértelműen kisebb volt. Véleményem szerint, ha más biológiai útvonalak érintettségével is, de itt is az 5-FU-hoz hasonló a koncentráció különbségből adódó folyamatok játszódhatnak a háttérben.

Az eredmények alapján úgy gondolom, hogy a hosszú távú kezelés hatására mind az 5-fluorouracil, mind pedig az imatinib mesylate változásokat okozott a halak anyagcsere folyamataiban. Az 5-FU esetében ennek egy korábbi munkánkban (Kovács et al. 2015) a toxikogenomikai vizsgálatban próbáltunk magyarázatot találni. Látható volt, hogy elsősorban az apoptotikus folyamatokkal és a DNS javító mechanizmusaival összefüggő gének szabályozódtak felül (*bcl2*, *xrcc5*, stb.), míg a fehérje szintézissel kapcsolatos több gén alulszabályozott volt (*cth*, stb.). Bár voltak folyamatok, melyek a nanogrammos koncentráció tartományban felülregulálódtak (pl. szignál transzdukciós folyamatok, immunfolyamatok) és a mikrogrammos tartományban nem szabályozódtak túl. Az ellenkezőjére is volt példa, ahol a kisebb tartományban a gének alulműködtek (pl. transzmembrán folyamatok, riboszóma biogenezis), míg a nagyobb koncentráció tartományban nem volt kimutatható hatás. Olyan azonban nem volt megfigyelhető, hogy egyes folyamatok az egyik koncentráció tartományban felülszabályozódtak és a másikban alulszabályozódtak volna. Az IM esetében, bár ilyen eredmények még nem állnak a rendelkezésemre, az anyag tirozin kináz inhibitoroként, több élettani szempontból fontos útvonalat befolyásol (Kübler et al. 2005).

6.5.4 Szaporodásbiológiai folyamatok

A halakon végzett hosszú távú vizsgálatok egyik fontos végpontja a szaporodási képesség vizsgálata. Ezen belül is elsősorban a lerakott ikrák számát, a termékenyülés arányát, illetve az ivararányt szokás meghatározni. Vizsgálataim során egyik anyag esetében sem volt különbség sem a lerakott ikrák számában, sem pedig az ikratételek minőségében. Bár a felnőtt halak testparamétereiben volt különbség a kezelések hatására, ez azonban nem befolyásolta a halak szaporodási képességeit. Ugyancsak nem volt eltolódás az ivarok esetében egyik anyagnál sem. Ezek alapján bebizonyosodott, hogy az alkalmazott kísérleti beállítások mellett sem az 5-FU, sem pedig az IM nem csökkentette a halak reprodukciós képességét. Nurmio et al. (2008) imatinib-bel folytatott vizsgálataik nyomán leírták, hogy hím patkányok esetében lehetnek a kezelésnek rejtett hatásai a here fejlődésére, még ha ez nem is nyilvánult meg a termékenyítő képességben és az utódok fejlődésében. Az 5-FU esetében *Caenorhabditis elegans*-on írták le az ivarsejtek sejt ciklusának változást, illetve a lerakott peték számának csökkenését, bár csak 0,6 mg/l-es és ennél magasabb koncentrációknál (Kumar et al. 2010). Az IM-el kapcsolatban krónikus kitétség mellett nagy vízibőlhán csak 300 µg/l-es koncentráció mellett volt tapasztalható a szaporodási képesség 50%-os csökkenése (Parrella et al. 2014b). Ezzel szemben ennél a fajnál az 5-FU –re számított EC_{50} érték 26,4 µg/l volt (Parrella et al. 2014b).

Az 5-FU vizsgálata során a negyedik szaporítás alkalmával a halak által adott ikrák száma drasztikusan csökkent. Ez a tendencia, ha sokkal kisebb mértékben is, de az IM vizsgálatban kapott ikraszám eredményein is látható mind a kontrol, mind a kezelt csoportoknál. Ezek alapján megállapítható volt, hogy olyan periódust, melyben magasabb a lerakott ikrák száma, egy alacsonyabb lerakott ikraszámmal járó periódus követ. Eredményeimhez hasonlóan Fassbender és Braunbeck (2013a) metil-metanoszulfonáttal folytatott vizsgálatainak szaporítási eredményei alapján a F0 és az F1 generáció esetében a 26., illetve 16. szaporítás alapján is a zebradániók által leadott ikra mennyiségében is egyfajta ciklusosság volt felfedezhető.

A zebradániók esetében a lerakott ikraszám és az ívás eredményessége nagyban függ az alkalmazott szaporítási módszertől. Vizsgálataimban 2-2, illetve 3-3 nőstény és hím került a szaporítóedényekbe. Ezzel a módszerrel lehet a legpontosabb információkat gyűjteni a faj esetében a reprodukciós képességről. Ezért az irodalomban megtalálható munkák jelentős részében is a hosszú távú vizsgálatok során ezt a módszert alkalmazták (Diekmann et al. 2004a, Diekmann et al. 2004b, Soares et al. 2009, Fassbender és Braunbeck 2013a, Corrales et al. 2014, Coimbra et al. 2015).

6.5.5 Szövetteni vizsgálatok

A hisztopatológiai vizsgálatok fontos részét képezhetik a krónikus toxikológiai vizsgálatoknak. Halak esetében mégis elsősorban az ivarszervek fejlődését és működését is befolyásoló, hormon hatású vegyületek krónikus tesztjeiben alkalmazzák (Nakari és Erkoma 2003, Seki et al. 2003, Seki et al. 2004, Nakamura et al. 2015). A más hatásmechanizmusú anyagok, mint például a vér koleszterin szint csökkentésére alkalmazott klofibrát sav (Coimbra et al. 2015), vagy komplex környezeti minták tesztelésekor (Sowers et al. 2009) a hisztopatológiai vizsgálatok leginkább az ivarszervek tanulmányozására terjedtek ki. Az EPA (2003) által javasolt protokollokban, illetve az OECD (2015) 240-es, medakára kidolgozott két generációs kísérleti tervben a szövetteni vizsgálatok kiterjesztését javasolják az ivarszerveken kívül a májra és a vesére is.

Az 5-FU-val kezelt halak szövetteni metszeteinek hisztopatológiai értékelése során elváltozásokat tapasztaltam a máj és a vese esetében. Az ivarszerveken szövetteni vizsgálatokor nem volt látható semmilyen kóros elváltozás, csakúgy, mint az idegrendszer, a kopolyú és az emésztőtraktus esetében sem. Ez is alátámasztja a szaporodásbiológiai vizsgálatok eredményeit, mely szerint az 5-FU-nak nincs hatása a halak reprodukciós képességeire. Az 1 és 100 µg/l-el kezelt F1 felnőtt halaknál megfigyelt máj atrófia nagy hasonlóságot mutat El-Sayyad et al. (2009) munkájában tapasztaltakkal. Az alacsony (10 mg/testtömeg kg) és a terápiás dózist megközelítő (20 mg/testtömeg kg) koncentrációval kezelt albínó patkányoknál is a máj károsodása volt látható.

A 10 ng/l-es és az 1 µg/l-es kezelési csoportban a halaknál a vese vérképző szövetének enyhe hiperpláziáját lehetett látni. A 100 µg/l-el kezelt csoportnál a vérképző szövet atrófiáján kívül a tubulonefrotikus elváltozás is megfigyelhető volt. A zebradánió esetében a vérképző szövet a vese velőállományában található, mely funkciójában megegyezik az emlősök csontvelőjével (Amatruda és Zon 1999). A megfigyelt elváltozások nagy hasonlóságot mutatnak az 5-FU emlősökön jól ismert csökkent csontvelő működéssel (Schuetz et al. 1984).

6.6 *Az antineoplasztikus vegyületek vizsgálatának általános értékelése*

Jelenleg több mint 50 citotoxikus hatású gyógyszert alkalmaznak a klinikai gyakorlatban a fejlett országokban (BMA 2006). Sajnos, ezeknek a szereknek a felhasználása folyamatosan növekszik (DoH 2004, Johnson et al. 2008) és ezzel mind nagyobb mennyiség kerül metabolizált, vagy anyamolekula formájában szennyvizetekbe és onnan az élővizetekbe. Az elvégzett vizsgálatok alapján látható, hogy az akut és a szub-krónikus tesztek alapján egyik vegyület sem tekinthető veszélyesnek a halakra. Ha emellett megvizsgáljuk az irodalomban megtalálható mért, vagy prediktív környezeti értékeket (Johnson et al. 2008, Besse et al. 2012, Xie 2012) látható, hogy

több nagyságrend a különbség a környezeti és a rövid távú kitettség esetében jelentkező, már toxikus hatást mutató koncentrációk között. Amennyiben azonban a több generációs vizsgálat eredményeit tekintjük át, az 5-FU esetében az F1 halak szöveti degenerációja már a környezeti koncentrációhoz közeli 10 ng/l-es tartományban is megfigyelhető volt. Míg az IM esetében az F2 generáció mortalitása igazolhatóan nagyobb volt ugyanebben a koncentráció tartományban is. Ezen vizsgálatok alapján egyértelmű, hogy a hosszú távú kitettség mellett a környezeti koncentrációhoz közeli tartományban is megjelennek a vizsgált gyógyszerek negatív hatásai a gerinces vízi szervezetekben. Eredményeim alapján nem zárható ki, hogy a természetes vizekben megjelenő gyógyszer-molekulák, ha csak nano- vagy pikogrammos mennyiségben is, de visszajuthatnak az ivóvízbe. A különböző víztisztítási technológiák során azonban feltételezhetően olyan új metabolitok keletkezhetnek, melyeknek hatása még teljesen ismeretlen.

6.7 *Javaslatok*

- A dolgozatban bemutatott akut embrió toxicitás teszteket még a FET teszt egy tervezete alapján végeztem (OECD 2006). A 2013-ban bevezetett, már végleges FET protokoll (OECD 2013a) is 96 órás korig javasolja a halak kezelését. Véleményem szerint a teszt időtartamának 120 órára történő megnyújtása számos előnnyel járna. Mivel a zebradánió lárvák inkubációs hőmérséklettől függően 72 és 90 óra között kelnek, ezért a 96 órás expozíció esetében előfordulhat, hogy a kelés elnyúlása miatt nem minden egyed fog kikelni akár a kontrol csoportban sem. Ezt a problémát a 24 órával növelt kezelési idő egyértelműen kiküszöbölné és pontosabb adatokat kaphatnánk a vizsgált molekula kelésre gyakorolt hatásáról. A teszt meghosszabbításának további előnye lenne, hogy a 120 órás, már elúszó halakon végezhető lenne mozgás aktivitás vizsgálat (locomotor response), mely kvantitatív mérésére alkalmas rendszerek egyre több laborban megtalálhatóak.
- A zebradánió halfajon végzett reprodukciós képességet is vizsgáló toxikológiai tesztek során legalább 5 szaporítást kell végezni, mellyel már csökkenthető a lerakott ikra mennyiség ciklikusságának torzító hatása az eredményekben.
- A keverékek tesztelésekor nyilvánvalóvá vált, hogy a mortalitás, mint végpont nem tökéletes a keverékek hatásának tanulmányozásához. Erre zebradánió embriók esetében is olyan szub-letális végpontot kell választani, mely jól reprezentálja az adott anyagok hatását. Ilyen szub-letális hatás vizsgálathoz viszont szükséges a FET teszt módosítása, hogy több ismétlésben vizsgálható legyen a megjelenő elváltozások aránya. A FET teszt esetében megoldás lehet a teszt végén a halak testhosszának mérése, mellyel az

életben maradt egyedeknél jól számszerűsíthető paraméter alapján lehetne a csoportokat összehasonlítani.

- A többgenerációs vizsgálatok alapján látható volt, hogy mindkét vegyület esetében számolni kell a nanogrammos koncentráció tartományban is a hosszú távú hatásokkal a vízi szervezetek esetében. Ezért mindenképpen javasolnám a citotoxikus vegyületek esetében a becsült környezeti koncentráció (PEC) közelében hal modellen legalább teljes életciklus tesztet végezni. Az Európai Gyógyszer Ügynökség (EMA-Europen Medicines Agency) jelenlegi szabályozása szerint csak a 10 ng/l vagy annál magasabb PEC érték esetében (EMA 2006) szükséges *Phase II., Tiar A* vizsgálatokat végezni, melybe beletartozik a halak korai életszakasz vizsgálata is (OECD 210). Az ilyen tesztek alapján azonban, mint az szub-krónikus vizsgálataimból is látható volt, nem lehet mindig elegendő információt szerezni ilyen erős biológiai hatású vegyületek hosszú távú hatásairól.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Az átlagéletkor és az életszínvonal növekedésének következtében folyamatosan nő az egészségünk megóvása érdekében felhasznált gyógyszerek mennyisége, ennek következtében pedig egyre több gyógyszerhatóanyag jut ki a környezetbe. Az antineoplasztikus vegyületek a környezeti mintákban növekvő mennyiségben való megjelenése különösen aggasztó. Ezek a vegyületek igen erőteljes biológia hatással rendelkeznek, így különösen fontos megismernünk a nem célszervezetekre, mint amilyenek a halak is, gyakorolt hatásukat.

Vizsgálataim során négy különböző hatásmechanizmusú antineoplasztikus vegyület toxicitását vizsgáltam zebradánió (*Danio rerio*) modellen. Az 5-fluorouracil (5-FU), a cisplatin (CisP), az etoposide (ET) és az imatinib (IM) esetében is akut toxicitás tesztet végeztem felnőtt halakon. Emellett zebradánió embriókon vizsgáltam a vegyületek teratogén és letális hatását az embrionális fejlődés során. Vizsgáltam továbbá a cisplatin és az imatinib keverékének toxicitását, valamint összevettem a kapott eredményeket a Bliss-féle független hatás és a Loew-féle koncentráció összeadódás predikciós módszerek eredményeivel. További toxicitás vizsgálatokat végeztem az 5-fluorouracil és az imatinib esetében az anyagok halak korai életszakaszában megfigyelhető hatásainak megismerésére. Emellett pedig ugyanezen két vegyület esetében több generáción keresztül is vizsgáltam a halak fejlődésére gyakorolt hatásukat, a környezeti koncentráció tartományában is.

Eredményeim alapján felnőtt halakra a legtoxikusabbnak a CisP bizonyult. 96 órás kitettség mellett az LC_{50} érték 64,5 mg/l volt. Az embriók vizsgálata során a cisplatin bizonyult a legmérgezőbbnek, már 27,5 mg/l-es koncentrációnál a fejlődő embriók fele nem tudott kikelni. A letalitás szempontjából az IM hatása volt a legerősebb, 120 órás expozíció esetén 65,9 mg/l volt az LC_{50} érték. A CisP és az IM keverékének vizsgálatakor a prediktív modellekhez képest csaknem kétszerese volt a keverék valós letális hatása az embriókra. Az 5-FU korai életszakasz teszt során igazolhatóan csökkent a fiatal halak túlélése a 10 mg/l-es kezelés hatására, valamint az 1 mg/l-es csoportban a halak standard testhossza szignifikánsan nagyobb volt a kontrollhoz képest. Az IM esetében a pusztulás ugyancsak a 10 mg/l-es kezelésnél bizonyult szignifikánsan különbözőnek a kontrolltól, a halak testparamétereiben azonban nem volt látható különbség. A többgenerációs kezelések hatására az 5-FU-val kezelt felnőtt halak F1 generációjának testtömege igazolhatóan kisebb volt a 10 ng/l-es koncentrációban, míg az 1 µg/l és a 100 µg/l kezeléseknél halak testtömege nagyobb volt a kontrollhoz képest. Az IM esetében pedig az F2 generáció egyedeinek túlélése csökkent szignifikánsan a 10 ng/l-es, a 1 µg/l-es és a 100 µg/l-es kezelések esetében is.

Eredményeim alapján látható volt, hogy a vizsgált vegyületek, bár rövid kitettség esetén nem bizonyultak toxikusnak a halakra hosszútávú, több generációs expozíció alatt már jelentős hatásuk volt az állatok fejlődésére, még nanogrammos koncentráció tartományban is.

8. SUMMARY

Due to the increase of average age and standard of living of the humankind, the consumption of different pharmaceuticals has been rising continuously. Therefore, more and more drugs get into the environment. The increase of antineoplastic agents in environmental samples is particularly worrying. Because of the biological activity of these drugs, it is very important to learn more about potential effects of these agents on the non-target organism.

Four antineoplastic drugs toxicity were studied on zebrafish (*Danio rerio*). Acute toxicity of 5-fluorouracil (5-FU), cisplatin (CisP), etoposide (ET) and imatinib mesylate (IM) were tested on adult fish. Further acute tests were done to investigate lethal and teratogenic effects on zebrafish embryos. In case of cisplatin and imatinib, binary mixtures toxicity was tested and results were compared with results of Bliss independence model and concentration addition predictive model by Loewe. Sub-chronic toxicity tests were carried out to investigate effects of 5-fluorouracil and imatinib on the early life stage of zebrafish. Besides, effects of these two chemicals were studied in multi generation experiments with environmental concentration range.

In case of acute adult test CisP was the most toxic agent. 96 hours LC_{50} estimated to be 64,5 mg/l. Cisplatin was the most toxic in embryo assays as well. Hatching inhibition has been investigated by half of the population by 27,5 mg/l concentration level. LC_{50} of IM value was the lowest during embryo test; 120 hours LC_{50} estimated to be 65,9 mg/l. Investigated lethality rate of CisP and IM mixtures were almost two times higher on embryos than Bliss and Loewe models predicted. Lethality of fish was increased in 10 mg/l treatment as standard body length was significantly increased during early life stage test of 5-FU. In case of 10 mg/l treatment lethality was significantly higher during early life stage test of IM.

After multi generation exposure, the 5-FU treatment caused a significant decrease of body weight of F1 generation adult zebrafish in 10 ng/l treatment and a significant increase in 1 μ g/l and 100 μ g/l treatments. In the other multi generation experiment, a significant increase of F2 generation fish mortality was investigated in 10 ng/l, 1 μ g/l, and 100 μ g/l groups after long term IM treatment.

Toxicity of the four investigated antineoplastic drugs were low after short term exposure but after long-term, multi generation exposure their influence on the development of fish, even in nanogram concentration, was significant.

9. MELLÉKLETEK

9.1 MI Irodalomjegyzék

Aherne G., Briggs R. (1989): The relevance of the presence of certain synthetic steroids in the aquatic environment. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 41(10): 735-736.

Aherne G.W., Hardcastle A., Nield A.H. (1990): Cytotoxic drugs and the aquatic environment: estimation of bleomycin in river and water samples. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 42(10): 741-742.

Alexy R., Sommer A., Lange F.T., Kümmerer K. (2006): Local use of antibiotics and their input and fate in a small sewage treatment plant – significance of balancing and analysis on a local scale vs. nationwide scale. *Acta hydrochimica et hydrobiologica*, 34(6): 587-592.

Altenburger R., Backhaus T., Boedeker W., Faust M., Scholze M., Grimme L.H. (2000): Predictability of the toxicity of multiple chemical mixtures to *Vibrio fischeri*: Mixtures composed of similarly acting chemicals. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19(9): 2341-2347.

Amatruda J.F., Zon L.I. (1999): Dissecting hematopoiesis and disease using the zebrafish. *Dev Biol*, 216(1): 1-15.

Andreozzi R., Caprio V., Ciniglia C., de Champdoré M., Lo Giudice R., Marotta R., Zuccato E. (2004): Antibiotics in the Environment: Occurrence in Italian STPs, Fate, and Preliminary Assessment on Algal Toxicity of Amoxicillin. *Environmental Science & Technology*, 38(24): 6832-6838.

Ankley G.T., Johnson R.D. (2004): Small fish models for identifying and assessing the effects of endocrine-disrupting chemicals. *Ilar j*, 45(4): 469-483.

Backhaus T., Altenburger R., Boedeker W., Faust M., Scholze M., Grimme L.H. (2000): Predictability of the toxicity of a multiple mixture of dissimilarly acting chemicals to *Vibrio fischeri*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19(9): 2348-2356.

Baker D.E. (2002): Imatinib mesylate. *Rev Gastroenterol Disord*, 2(2): 75-86.

Bantle J.A., Burton D.T., Dawson D.A., Dumont J.N., Finch R.A., Fort D.J., Linder G., Rayburn J.R., Buchwalter D., Maurice M.A. (1994): Initial interlaboratory validation study of FETAX: phase I testing. *J Appl Toxicol*, 14(3): 213-223.

Barna G. (2005): Az apoptózis szabályozása természetes és mesterséges anyagokkal. I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet. Budapest, Semmelweis Egyetem. PhD disszertáció.

Beccari E., Modigliani P., Morpurgo G. (1967): Induction of inter- and intragenic mitotic recombination by fluorodeoxyuridine and fluorouracil in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 56(1): 7-12.

Béni S. (2007): Az imatinib protonálódásának, ciklodextrinbe és liposzómába épülésének egyensúlyi és szerkezeti jellemzése. Gyógyszerészi Kémiai Intézet Budapest, Semmelweis Egyetem. PhD disszertáció.

Besse J.P., Latour J.F., Garric J. (2012): Anticancer drugs in surface waters: what can we say about the occurrence and environmental significance of cytotoxic, cytostatic and endocrine therapy drugs? *Environ Int*, 39(1): 73-86.

Bhandari R.K., vom Saal F.S., Tillitt D.E. (2015): Transgenerational effects from early developmental exposures to bisphenol A or 17 α -ethinylestradiol in medaka, *Oryzias latipes*. *Scientific Reports*, 5: 9303.

Bliss C. (1939): The toxicity of poisons applied jointly. *Annals of applied biology*, 26(3): 585-615.

BMA (2006): "BNF51 – The British National Formulary." from <http://www.bccancer.bc.ca/HPI/DrugDatabase/DrugIndexPro/default.htm>.

Boleda M.R., Galceran M.T., Ventura F. (2007): Trace determination of cannabinoids and opiates in wastewater and surface waters by ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1175(1): 38-48.

Booker V., Halsall C., Llewellyn N., Johnson A., Williams R. (2014): Prioritising anticancer drugs for environmental monitoring and risk assessment purposes. *Sci Total Environ*, 473-474: 159-170.

Bouki C., Venieri D., Diamadopoulos E. (2013): Detection and fate of antibiotic resistant bacteria in wastewater treatment plants: A review. *Ecotoxicology and environmental safety*, 91: 1-9.

Brain R.A., Johnson D.J., Richards S.M., Sanderson H., Sibley P.K., Solomon K.R. (2004): Effects of 25 pharmaceutical compounds to *Lemna gibba* using a seven-day static-renewal test. *Environ Toxicol Chem*, 23(2): 371-382.

Braunbeck T., Boettcher M., Hollert H., Kosmehl T., Lammer E., Leist E., Rudolf M., Seitz N. (2005): Towards an alternative for the acute fish LC(50) test in chemical assessment: the fish embryo toxicity test goes multi-species -- an update. *Altex*, 22(2): 87-102.

Breccia M., Muscaritoli M., Aversa Z., Mandelli F., Alimena G. (2004): Imatinib mesylate may improve fasting blood glucose in diabetic Ph+ chronic myelogenous leukemia patients responsive to treatment. *Journal of Clinical Oncology*, 22(22): 4653-4655.

Brezovsek P., Elersek T., Filipic M. (2014): Toxicities of four anti-neoplastic drugs and their binary mixtures tested on the green alga *Pseudokirchneriella subcapitata* and the cyanobacterium *Synechococcus leopoliensis*. *Water Res*, 52: 168-177.

Brian J.V., Harris C.A., Scholze M., Backhaus T., Booy P., Lamoree M., Pojana G., Jonkers N., Runnalls T., Bonfà A. (2005): Accurate prediction of the response of freshwater fish to a mixture of estrogenic chemicals. *Environmental Health Perspectives*: 721-728.

Broderius S.J., Kahl M.D., Hoggund M.D. (1995): Use of joint toxic response to define the primary mode of toxic action for diverse industrial organic chemicals. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 14(9): 1591-1605.

Brozinski J.-M., Lahti M., Meierjohann A., Oikari A., Kronberg L. (2013): The Anti-Inflammatory Drugs Diclofenac, Naproxen and Ibuprofen are found in the Bile of Wild Fish

- Caught Downstream of a Wastewater Treatment Plant. *Environmental Science & Technology*, 47(1): 342-348.
- Buerge I.J., Buser H.-R., Poiger T., Müller M.D. (2006): Occurrence and Fate of the Cytostatic Drugs Cyclophosphamide and Ifosfamide in Wastewater and Surface Waters. *Environmental Science & Technology*, 40(23): 7242-7250.
- Buser H.-R., Müller M.D., Theobald N. (1998a): Occurrence of the Pharmaceutical Drug Clofibric Acid and the Herbicide Mecoprop in Various Swiss Lakes and in the North Sea. *Environmental Science & Technology*, 32(1): 188-192.
- Buser H.-R., Poiger T., Müller M.D. (1998b): Occurrence and Fate of the Pharmaceutical Drug Diclofenac in Surface Waters: Rapid Photodegradation in a Lake. *Environmental Science & Technology*, 32(22): 3449-3456.
- Buser H.-R., Poiger T., Müller M.D. (1999): Occurrence and Environmental Behavior of the Chiral Pharmaceutical Drug Ibuprofen in Surface Waters and in Wastewater. *Environmental Science & Technology*, 33(15): 2529-2535.
- Cahu C., Zambonino Infante J. (2001): Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae. *Aquaculture*, 200(1–2): 161-180.
- Caldwell D.J., Mastrocco F., Margiotta-Casaluci L., Brooks B.W. (2014): An integrated approach for prioritizing pharmaceuticals found in the environment for risk assessment, monitoring and advanced research. *Chemosphere*, 115: 4-12.
- Calza P., Massolino C., Monaco G., Medana C., Baiocchi C. (2008): Study of the photolytic and photocatalytic transformation of amiloride in water. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 48(2): 315-320.
- Camargo S., Francescato H., Lavrador M., Bianchi M. (2001): Oral administration of sodium selenite minimizes cisplatin toxicity on proximal tubules of rats. *Biological trace element research*, 83(3): 251-262.
- Carvalho A.P., Araújo L., Santos M.M. (2006): Rearing zebrafish (*Danio rerio*) larvae without live food: evaluation of a commercial, a practical and a purified starter diet on larval performance. *Aquaculture Research*, 37(11): 1107-1111.
- CHMP C.f.M.P.f.H.U. (2013): Glivec, International non-proprietary name: IMATINIB. Assessment Report London, Egyesült Királyság.
- Christensen F.M. (1998): Pharmaceuticals in the Environment—A Human Risk? *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 28(3): 212-221.
- Chu E. (2007): Clinical colorectal cancer: ode to 5-fluorouracil. *Clinical Colorectal Cancer*, 6(9): 609.
- Cleuvers M. (2002): Aquatische Ökotoxikologie ausgewählter Arzneimittel. *Umweltwissenschaften und Schadstoff-Forschung*, 14(2): 85-89.
- Cleuvers M. (2003): Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicol Lett*, 142(3): 185-194.

- Cleuvers M. (2004): Mixture toxicity of the anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, naproxen, and acetylsalicylic acid. *Ecotoxicology and environmental safety*, 59(3): 309-315.
- Coimbra A.M., Peixoto M.J., Coelho I., Lacerda R., Carvalho A.P., Gesto M., Lyssimachou A., Lima D., Soares J., Andre A., Capitao A., Castro L.F., Santos M.M. (2015): Chronic effects of clofibrac acid in zebrafish (*Danio rerio*): a multigenerational study. *Aquat Toxicol*, 160: 76-86.
- Collier A.C. (2007): Pharmaceutical Contaminants in Potable Water: Potential Concerns for Pregnant Women and Children. *EcoHealth*, 4(2): 164-171.
- Corrales J., Thornton C., White M., Willett K.L. (2014): Multigenerational effects of benzo [a] pyrene exposure on survival and developmental deformities in zebrafish larvae. *Aquatic Toxicology*, 148: 16-26.
- Cunningham V.L. (2008): Special Characteristics of Pharmaceuticals Related to Environmental Fate. *Pharmaceuticals in the Environment: Sources, Fate, Effects and Risks*. Kümmerer, K. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg: 23-34.
- Csenki Zs. (2011): Oocytá transzplantáció halakon (petesejt átültetés zebra-dánió (*Danio rerio*) halfajon). Halgazdálkodási Tanszék. Gödöllő, Magyarország, Szent István Egyetem. PhD disszertáció: 108.
- Dalrymple O.K., Yeh D.H., Trotz M.A. (2007): Removing pharmaceuticals and endocrine-disrupting compounds from wastewater by photocatalysis. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 82(2): 121-134.
- Daughton C.G., Ternes T.A. (1999): Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? *Environmental Health Perspectives*, 107(Suppl 6): 907-938.
- Dawson D.A., Bantle J.A. (1987): Development of a reconstituted water medium and preliminary validation of the frog embryo teratogenesis assay--*Xenopus* (FETAX). *J Appl Toxicol*, 7(4): 237-244.
- DellaGreca M., Iesce M.R., Isidori M., Montanaro S., Previtiera L., Rubino M. (2007): Phototransformation of Amlodipine in Aqueous Solution: Toxicity of the Drug and Its Photoproduct on Aquatic Organisms. *International Journal of Photoenergy*. cikk azonosító: 63459
- Desbrow C., Routledge E.J., Brighty G.C., Sumpter J.P., Waldock M. (1998): Identification of Estrogenic Chemicals in STW Effluent. 1. Chemical Fractionation and in Vitro Biological Screening. *Environmental Science & Technology*, 32(11): 1549-1558.
- DeVane C.L. (1999): Metabolism and pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors. *Cell Mol Neurobiol*, 19(4): 443-466.
- DeYoung D.J., Bantle J.A., Hull M.A., Burks S.L. (1996): Differences in sensitivity to developmental toxicants as seen in *Xenopus* and *Pimephales* embryos. *Bull Environ Contam Toxicol*, 56(1): 143-150.

Diekmann M., Hultsch V., Nagel R. (2004a): On the relevance of genotoxicity for fish populations I: effects of a model genotoxicant on zebrafish (*Danio rerio*) in a complete life-cycle test. *Aquatic Toxicology*, 68(1): 13-26.

Diekmann M., Waldmann P., Schnurstein A., Grummt T., Braunbeck T., Nagel R. (2004b): On the relevance of genotoxicity for fish populations II: genotoxic effects in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to 4-nitroquinoline-1-oxide in a complete life-cycle test. *Aquatic Toxicology*, 68(1): 27-37.

DoH (2004): Variations in usage of cancer drugs approved by NICE. Report of the review undertaken by the National Cancer Director. Egyesült Királyság.

Ducharme N.A., Reif D.M., Gustafsson J.-A., Bondesson M. (2015): Comparison of toxicity values across zebrafish early life stages and mammalian studies: Implications for chemical testing. *Reproductive Toxicology*, 55: 3-10.

Dutta S.P.S. (1993): Food and feeding habits of *Danio rerio* (Ham. Buch.) inhabiting Gadigarh stream, Jammu. *J. Freshw. Biol.*,(5): 165–168.

Egeler P., Seck C. (2009): 5-Fluorouracil: A study on the toxicity to early-life stages of *Danio rerio* (zebrafish), ECT Oekotoxikologie, Flörsheim/Main (DE) and Battelle UK, Ongar (UK). ECT 08AZ1FV.

El-Sayyad H.I., Ismail M.F., Shalaby F.M., Abou-El-Magd R.F., Gaur R.L., Fernando A., Raj M.H., Ouhtit A. (2009): Histopathological effects of cisplatin, doxorubicin and 5-fluorouracil (5-FU) on the liver of male albino rats. *Int J Biol Sci*, 5(5): 466-473.

El Gendy M.M., Kandil A.M., Helal M.A., Zahou F.M. (2015): The teratogenic effects of imatinib mesylate on rat fetuses. *Toxicology Reports*, 2: 654-663.

EMA (2006): Guideline on the environmental risk assessment of medicinal products for human use, Doc. Ref. EMEA/CHMP/SWP/4447/00.

Ensenbach U., Nagel R. (1997): Toxicity of binary chemical mixtures: effects on reproduction of zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Arch Environ Contam Toxicol*, 32(2): 204-210.

EPA (2003): Draft detailed review paper on a fish two-generation toxicity test. Prepared under WA 3-5. Task 3(<http://www.oecd.org/redirect/dataoecd/13/4/2497858>).

EPA (2004): Chemical hazard classification and labeling: Comparison of opp requirements and the GSH 1-22.

Fassbender C., Braunbeck T. (2013a): Reproductive and genotoxic effects in zebrafish after chronic exposure to methyl methanesulfonate in a multigeneration study. *Ecotoxicology*, 22(5): 825-837.

Fassbender C., Braunbeck T. (2013b): Assessment of genotoxicity in gonads, liver and gills of zebrafish (*Danio rerio*) by use of the comet assay and micronucleus test after in vivo exposure to methyl methanesulfonate. *Bull Environ Contam Toxicol*, 91(1): 89-95.

Faust M., Altenburger R., Backhaus T., Blanck H., Boedeker W., Gramatica P., Hamer V., Scholze M., Vighi M., Grimme L. (2001): Predicting the joint algal toxicity of multi-component

s-triazine mixtures at low-effect concentrations of individual toxicants. *Aquatic Toxicology*, 56(1): 13-32.

Fent K., Weston A.A., Caminada D. (2006): Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquat Toxicol*, 76(2): 122-159.

Fick J., Lindberg R.H., Tysklind M., Larsson D.G. (2010): Predicted critical environmental concentrations for 500 pharmaceuticals. *Regul Toxicol Pharmacol*, 58(3): 516-523.

Fong P.P. (1998): Zebra Mussel Spawning Is Induced in Low Concentrations of Putative Serotonin Reuptake Inhibitors. *The Biological Bulletin*, 194(2): 143-149.

Gacic Z., Kolarevic S., Sunjog K., Kracun-Kolarevic M., Paunovic M., Knezevic-Vukcevic J., Vukovic-Gacic B. (2014): The impact of in vivo and in vitro exposure to base analogue 5-FU on the level of DNA damage in haemocytes of freshwater mussels *Unio pictorum* and *Unio tumidus*. *Environ Pollut*, 191: 145-150.

Galus M., Jeyaranjaan J., Smith E., Li H., Metcalfe C., Wilson J.Y. (2013): Chronic effects of exposure to a pharmaceutical mixture and municipal wastewater in zebrafish. *Aquat Toxicol*, 132-133: 212-222.

Garcia S.N., Foster M., Constantine L.A., Huggett D.B. (2012): Field and laboratory fish tissue accumulation of the anti-convulsant drug carbamazepine. *Ecotoxicology and environmental safety*, 84: 207-211.

Gaudet- Hull A.M., Rayburn J.R., Bantle J.A., Burton D.T., Turley S.D., Dawson D.A., Dumont J.N., Finch R.A., Maurice M.A., Fort D.J. (1994): FETAX interlaboratory validation study: Phase II testing. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 13(10): 1629-1637.

Geisler R., Borel N., Ferg M., Maier J.V., Strahle U. (2016): Maintenance of Zebrafish Lines at the European Zebrafish Resource Center. *Zebrafish*, 13 Suppl 1: S19-23.

Giurgiovich A., Diwan B., Olivero O., Anderson L., Rice J., Poirier M. (1997): Elevated mitochondrial cisplatin-DNA adduct levels in rat tissues after transplacental cisplatin exposure. *Carcinogenesis*, 18(1): 93-96.

Golet E.M., Alder A.C., Giger W. (2002): Environmental Exposure and Risk Assessment of Fluoroquinolone Antibacterial Agents in Wastewater and River Water of the Glatt Valley Watershed, Switzerland. *Environmental Science & Technology*, 36(17): 3645-3651.

Gröner J. (1983): Biologische Abbaubarkeit und Toxizität von Fluorouracil und Natulan (für Roche Welwyn). Interne Mitteilung TSU/Nr. 52. 02/03/83. Roche, Basel (CH).

Gröning J., Held C., Garten C., Claußnitzer U., Kaschabek S.R., Schlömann M. (2007): Transformation of diclofenac by the indigenous microflora of river sediments and identification of a major intermediate. *Chemosphere*, 69(4): 509-516.

Guiney P.D., Melancon Jr M.J., Lech J.J., Peterson R.E. (1979): Effects of egg and sperm maturation and spawning on the distribution and elimination of a polychlorinated biphenyl in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Toxicology and Applied Pharmacology*, 47(2): 261-272.

- Hagerkvist R., Jansson L., Welsh N. (2008): Imatinib mesylate improves insulin sensitivity and glucose disposal rates in rats fed a high-fat diet. *Clin Sci (Lond)*, 114(1): 65-71.
- Haiß A., Kümmerer K. (2006): Biodegradability of the X-ray contrast compound diatrizoic acid, identification of aerobic degradation products and effects against sewage sludge micro-organisms. *Chemosphere*, 62(2): 294-302.
- Halling-Sørensen B., Nors Nielsen S., Lanzky P.F., Ingerslev F., Holten Lützhøft H.C., Jørgensen S.E. (1998): Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment- A review. *Chemosphere*, 36(2): 357-393.
- Hannah R., D'Aco V.J., Anderson P.D., Buzby M.E., Caldwell D.J., Cunningham V.L., Ericson J.F., Johnson A.C., Parke N.J., Samuelian J.H., Sumpter J.P. (2009): Exposure assessment of 17 α -ethinylestradiol in surface waters of the United States and Europe. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28(12): 2725-2732.
- Hartmann A., Alder A.C., Koller T., Widmer R.M. (1998): Identification of fluoroquinolone antibiotics as the main source of umuC genotoxicity in native hospital wastewater. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17(3): 377-382.
- Hassan M.S., Morgan A.M., Mekawy M.M., Zaki A.R., Ghazi Z.M. (2016): Teratogenic effect of cisplatin in rats and the protective role of sodium selenate. *Exp Toxicol Pathol*, 68(5): 277-287.
- Hatha M., Vivekanandhan A.A., Julie Joice G., Christol (2005): Antibiotic resistance pattern of motile aeromonads from farm raised fresh water fish. *International Journal of Food Microbiology*, 98(2): 131-134.
- Heberer T. (2002): Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicol Lett*, 131(1-2): 5-17.
- Heberer T., Schmidt-Bäumler K., Stan H.J. (1998): Occurrence and Distribution of Organic Contaminants in the Aquatic System in Berlin. Part I: Drug Residues and other Polar Contaminants in Berlin Surface and Groundwater. *Acta hydrochimica et hydrobiologica*, 26(5): 272-278.
- Heberer T., Stan H.J. (1997): Determination of Clofibric Acid and N-(Phenylsulfonyl)-Sarcosine in Sewage, River and Drinking Water. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 67(1-4): 113-124.
- Hernando M.D., Mezcuca M., Fernandez-Alba A.R., Barcelo D. (2006): Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. *Talanta*, 69(2): 334-342.
- Hignite C., Azarnoff D.L. (1977): Drugs and drug metabolites as environmental contaminants: chlorophenoxyisobutyrate and salicylic acid in sewage water effluent. *Life Sci*, 20(2): 337-341.
- Hill A.J., Teraoka H., Heideman W., Peterson R.E. (2005): Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicol Sci*, 86(1): 6-19.
- Hirsch R., Ternes T., Haberer K., Kratz K.-L. (1999): Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *Science of The Total Environment*, 225(1-2): 109-118.

- Hoang P.T.P., Managaki S., Nakada N., Takada H., Shimizu A., Anh D.H., Viet P.H., Suzuki S. (2011): Antibiotic contamination and occurrence of antibiotic-resistant bacteria in aquatic environments of northern Vietnam. *Science of The Total Environment*, 409(15): 2894-2901.
- Hoeger B., Köllner B., Dietrich D.R., Hitzfeld B. (2005): Water-borne diclofenac affects kidney and gill integrity and selected immune parameters in brown trout (*Salmo trutta f. fario*). *Aquatic Toxicology*, 75(1): 53-64.
- Holdway D.A., Heffernan J., Smith A. (2008): Multigeneration assessment of nonylphenol and endosulfan using a model Australian freshwater fish, *Melanotaenia fluviatilis*. *Environ Toxicol*, 23(2): 253-262.
- Holmberg A., Schwerte T., Pelster B., Holmgren S. (2004): Ontogeny of the gut motility control system in zebrafish *Danio rerio* embryos and larvae. *J Exp Biol*, 207(Pt 23): 4085-4094.
- Horváth L. (1980): A ponty (*Cyprinus carpio*) petesejtfejlődésének elemzése és szabályozása. A halhústermelés fejlesztése. Oláh, J. Szarvas, Haltenyésztési Kutató Intézet: 6-21.
- Huggett D.B., Brooks B.W., Peterson B., Foran C.M., Schlenk D. (2002): Toxicity of Select Beta Adrenergic Receptor-Blocking Pharmaceuticals (B-Blockers) on Aquatic Organisms. *Arch Environ Contam Toxicol*, 43(2): 229-235.
- Huggett D.B., Khan I.A., Foran C.M., Schlenk D. (2003): Determination of beta-adrenergic receptor blocking pharmaceuticals in united states wastewater effluent. *Environmental Pollution*, 121(2): 199-205.
- Isidori M., Lavorgna M., Nardelli A., Parrella A., Previtera L., Rubino M. (2005a): Ecotoxicity of naproxen and its phototransformation products. *Science of The Total Environment*, 348(1-3): 93-101.
- Isidori M., Lavorgna M., Nardelli A., Pascarella L., Parrella A. (2005b): Toxic and genotoxic evaluation of six antibiotics on non-target organisms. *Science of The Total Environment*, 346(1-3): 87-98.
- Isidori M., Nardelli A., Pascarella L., Rubino M., Parrella A. (2007): Toxic and genotoxic impact of fibrates and their photoproducts on non-target organisms. *Environ Int*, 33(5): 635-641.
- Jeney A., Kralovánszky J. (2007): A daganatos megbetegedések gyógyszerei. Farmakológia. Gyires and Fürst. Budapest, Medicina Könyvkiadó Zrt.: 949-983.
- Jobling M., Johansen S.J.S., Foshaug H., Burkow I.C., Jørgensen E.H. (1997): Lipid dynamics in anadromous Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.): seasonal variations in lipid storage depots and lipid class composition. *Fish Physiology and Biochemistry*, 18(3): 225-240.
- Johnson A.C., Jürgens M.D., Williams R.J., Kümmerer K., Kortenkamp A., Sumpter J.P. (2008): Do cytotoxic chemotherapy drugs discharged into rivers pose a risk to the environment and human health? An overview and UK case study. *Journal of Hydrology*, 348(1): 167-175.
- Johnson R.B. (2009): Lipid Deposition in Oocytes of Teleost Fish During Secondary Oocyte Growth. *Reviews in Fisheries Science*, 17(1): 78-89.

Jones O.A.H., Voulvoulis N., Lester J. (2004): Potential ecological and human health risks associated with the presence of pharmaceutically active compounds in the aquatic environment. *Critical reviews in toxicology*, 34(4): 335-350.

Kaiser K.L., Palabrica V.S. (1991): Photobacterium phosphoreum toxicity data index. *Water Quality Research Journal of Canada*, 26(3): 361-431.

Kallenborn R., Fick J., Lindberg R., Moe M., Nielsen K.M., Tysklind M., Vasskog T. (2008): Pharmaceutical Residues in Northern European Environments: Consequences and Perspectives. *Pharmaceuticals in the Environment: Sources, Fate, Effects and Risks*. Kümmerer, K. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg: 61-74.

Kalsch W. (1999): Biodegradation of the iodinated X-ray contrast media diatrizoate and iopromide. *Science of The Total Environment*, 225(1-2): 143-153.

Katsnelson B.A., Privalova L.I., Varaksin A.N., Kazmer J.I., Kireyeva E.P., Panov V.G. (2011): An approach to characterizing the type of combined environmental toxicity based on epidemiologically assessed exposure-response relationships. *Open Epidemiology Journal*, 4: 60-69.

Keller K.A., Aggarwal S.K. (1983): Embryotoxicity of cisplatin in rats and mice. *Toxicol Appl Pharmacol*, 69(2): 245-256.

Kidd K.A., Blanchfield P.J., Mills K.H., Palace V.P., Evans R.E., Lazorchak J.M., Flick R.W. (2007): Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(21): 8897-8901.

Kim M.J., Choi J., Kim N., Han G.C. (2014): Behavioral changes of zebrafish according to cisplatin-induced toxicity of the balance system. *Hum Exp Toxicol*, 33(11): 1167-1175.

Kim S., Jung D., Kho Y., Choi K. (2014): Effects of benzophenone-3 exposure on endocrine disruption and reproduction of Japanese medaka (*Oryzias latipes*)--a two generation exposure study. *Aquat Toxicol*, 155: 244-252.

Kimmel C.B., Ballard W.W., Kimmel S.R., Ullmann B., Schilling T.F. (1995): Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn*, 203(3): 253-310.

Kinth P., Mahesh G., Panwar Y. (2013): Mapping of zebrafish research: a global outlook. *Zebrafish*, 10(4): 510-517.

Kiss I. (1997): *Toxikológia. Veszprém, Veszprémi Egyetemi Kiadó.*

Kolpin D.W., Furlong E.T., Meyer M.T., Thurman E.M., Zaugg S.D., Barber L.B., Buxton H.T. (2002): Pharmaceuticals, Hormones, and Other Organic Wastewater Contaminants in U.S. Streams, 1999-2000: A National Reconnaissance. *Environmental Science & Technology*, 36(6): 1202-1211.

Kosjek T., Heath E. (2011): Occurrence, fate and determination of cytostatic pharmaceuticals in the environment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 30(7): 1065-1087.

Kosjek T., Perko S., Zigon D., Heath E. (2013): Fluorouracil in the environment: analysis, occurrence, degradation and transformation. *J Chromatogr A*, 1290: 62-72.

- Kovács R., Csenki Z., Bakos K., Urbányi B., Horváth Á., Garaj-Vrhovac V., Gajski G., Gerić M., Negreira N., de Alda M.L. (2015): Assessment of toxicity and genotoxicity of low doses of 5-fluorouracil in zebrafish (*Danio rerio*) two-generation study. *Water Res*, 77: 201-212.
- Kovalova L., McArdell C.S., Hollender J. (2009): Challenge of high polarity and low concentrations in analysis of cytostatics and metabolites in wastewater by hydrophilic interaction chromatography/tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 1216(7): 1100-1108.
- Kumar S., Aninat C., Michaux G., Morel F. (2010): Anticancer drug 5-fluorouracil induces reproductive and developmental defects in *Caenorhabditis elegans*. *Reprod Toxicol*, 29(4): 415-420.
- Kundi M., Parrella A., Lavorgna M., Criscuolo E., Russo C., Isidori M. (2015): Prediction and assessment of ecogenotoxicity of antineoplastic drugs in binary mixtures. *Environ Sci Pollut Res Int*.
- Kübler H.R., Randenborgh H.v., Treiber U., Wutzler S., Battistel C., Lehmer A., Wagenpfeil S., Hartung R., Paul R. (2005): In vitro cytotoxic effects of imatinib in combination with anticancer drugs in human prostate cancer cell lines. *The Prostate*, 63(4): 385-394.
- Kümmerer K. (2001): Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources--a review. *Chemosphere*, 45(6-7): 957-969.
- Kümmerer K. (2009a): The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use--present knowledge and future challenges. *J Environ Manage*, 90(8): 2354-2366.
- Kümmerer K. (2009b): Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part II. *Chemosphere*, 75(4): 435-441.
- Kümmerer K. (2010): Pharmaceuticals in the environment. *Annual review of environment and resources*, 35: 57-75.
- Kümmerer K., Al-Ahmad A. (2010): Estimation of the cancer risk to humans resulting from the presence of cyclophosphamide and ifosfamide in surface water. *Environmental Science and Pollution Research*, 17(2): 486-496.
- Kümmerer K., al-Ahmad A., Bertram B., Wiessler M. (2000): Biodegradability of antineoplastic compounds in screening tests: influence of glucosidation and of stereochemistry. *Chemosphere*, 40(7): 767-773.
- Kümmerer K., Haiß A., Schuster A., Hein A., Ebert I. (2016): Antineoplastic compounds in the environment—substances of special concern. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(15): 14791-14804.
- Kümmerer K., Helmers E. (1997): Hospital effluents as a source for platinum in the environment. *Science of The Total Environment*, 193(3): 179-184.
- Kümmerer K., Henninger A. (2003): Promoting resistance by the emission of antibiotics from hospitals and households into effluent. *Clinical Microbiology and Infection*, 9(12): 1203-1214.

Kümmerer K., Steger-Hartmann T., Meyer M. (1997): Biodegradability of the anti-tumour agent ifosfamide and its occurrence in hospital effluents and communal sewage. *Water Res*, 31(11): 2705-2710.

Kwon J.W., Armbrust K.L. (2006): Laboratory persistence and fate of fluoxetine in aquatic environments. *Environ Toxicol Chem*, 25(10): 2561-2568.

Laale H.W. (1977): The biology and use of zebrafish, *Brachydanio rerio* in fisheries research. *Journal of Fish Biology*, 10(2): 121-173.

Lammer E., Carr G.J., Wendler K., Rawlings J.M., Belanger S.E., Braunbeck T. (2009): Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 149(2): 196-209.

Länge R., Hutchinson T.H., Croudace C.P., Siegmund F., Schweinfurth H., Hampe P., Panter G.H., Sumpter J.P. (2001): Effects of the synthetic estrogen 17 α -ethinylestradiol on the life-cycle of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20(6): 1216-1227.

Lau C., Andersen M.E., Crawford-Brown D.J., Kavlock R.J., Kimmel C.A., Knudsen T.B., Muneoka K., Rogers J.M., Setzer R.W., Smith G., Tyl R. (2000): Evaluation of biologically based dose-response modeling for developmental toxicity: a workshop report. *Regul Toxicol Pharmacol*, 31(2 Pt 1): 190-199.

Lawrence C. (2007): The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. *Aquaculture*, 269(1-4): 1-20.

Lee C., Schmidt C., Yoon J., von Gunten U. (2007): Oxidation of N-Nitrosodimethylamine (NDMA) Precursors with Ozone and Chlorine Dioxide: Kinetics and Effect on NDMA Formation Potential. *Environmental Science & Technology*, 41(6): 2056-2063.

Lenz K., Mahnik S.N., Weissenbacher N., Mader R.M., Krenn P., Hann S., Koellensperger G., Uhl M., Knasmüller S., Ferk F., Bursch W., Fuerhacker M. (2007): Monitoring, removal and risk assessment of cytostatic drugs in hospital wastewater. *Water Sci Technol*, 56(12): 141-149.

Li S.-W., Lin A.Y.-C. (2015): Increased acute toxicity to fish caused by pharmaceuticals in hospital effluents in a pharmaceutical mixture and after solar irradiation. *Chemosphere*, 139: 190-196.

Lien E.J., Ou X.-c. (1985): Carcinogenicity of some anticancer drugs - a survey. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 10(3): 223-242.

Lin A.Y., Lin Y.C., Lee W.N. (2014): Prevalence and sunlight photolysis of controlled and chemotherapeutic drugs in aqueous environments. *Environ Pollut*, 187: 170-181.

Loewe S. (1953): The problem of synergism and antagonism of combined drugs. *Arzneimittelforschung*, 3(6): 285-290.

Loewe S., Muischnek H. (1926): Über Kombinationswirkungen. *Naunyn-Schmiedeberg's Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie*, 114(5): 313-326.

- Longley D.B., Harkin D.P., Johnston P.G. (2003): 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer*, 3(5): 330-338.
- Lorraine G.A., Pettigrove M.E. (2006): Seasonal Variations in Concentrations of Pharmaceuticals and Personal Care Products in Drinking Water and Reclaimed Wastewater in Southern California. *Environmental Science & Technology*, 40(3): 687-695.
- Lützhøft H.-C.H., Halling-Sørensen B., Jørgensen S. (1999): Algal toxicity of antibacterial agents applied in Danish fish farming. *Arch Environ Contam Toxicol*, 36(1): 1-6.
- MacRae C.A., Peterson R.T. (2015): Zebrafish as tools for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*, 14(10): 721-731.
- Mahnik S.N., Lenz K., Weissenbacher N., Mader R.M., Fuerhacker M. (2007): Fate of 5-fluorouracil, doxorubicin, epirubicin, and daunorubicin in hospital wastewater and their elimination by activated sludge and treatment in a membrane-bio-reactor system. *Chemosphere*, 66(1): 30-37.
- Mahnik S.N., Rizovski B., Fuerhacker M., Mader R.M. (2004): Determination of 5-fluorouracil in hospital effluents. *Anal Bioanal Chem*, 380(1): 31-35.
- Marr J.C.A., Hansen J.A., Meyer J.S., Cacula D., Podrabsky T., Lipton J., Bergman H.L. (1998): Toxicity of cobalt and copper to rainbow trout: application of a mechanistic model for predicting survival. *Aquatic Toxicology*, 43(4): 225-238.
- Maskaoui K., Zhou J.L. (2010): Colloids as a sink for certain pharmaceuticals in the aquatic environment. *Environmental Science and Pollution Research*, 17(4): 898-907.
- Masser M.P., Rakocy J., Losordo T. (1999) Recirculating aquaculture tank production systems: management of recirculating systems. *Southern Regional Aquaculture Publication* 452.
- Matthews M., Trevarrow B., Matthews J. (2002): A virtual tour of the Guide for zebrafish users. *Lab Anim (NY)*, 31(3): 34-40.
- Mayer F., Honecker F., Looijenga L.H., Bokemeyer C. (2003): Towards an understanding of the biological basis of response to cisplatin-based chemotherapy in germ-cell tumors. *Ann Oncol*, 14(6): 825-832.
- McKim J.M. (1977): Evaluation of tests with early life stages of fish for predicting long-term toxicity. *Journal of the Fisheries Board of Canada*, 34(8): 1148-1154.
- Méndez-Arriaga F., Esplugas S., Giménez J. (2008): Photocatalytic degradation of non-steroidal anti-inflammatory drugs with TiO₂ and simulated solar irradiation. *Water Res*, 42(3): 585-594.
- Mennigen J.A., Stroud P., Zamora J.M., Moon T.W., Trudeau V.L. (2011): Pharmaceuticals as neuroendocrine disruptors: lessons learned from fish on Prozac. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*, 14(5-7): 387-412.
- Nakamura A., Tamura I., Takanobu H., Yamamuro M., Iguchi T., Tatarazako N. (2015): Fish multigeneration test with preliminary short-term reproduction assay for estrone using Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *J Appl Toxicol*, 35(1): 11-13.

- Nakari T., Erkomaa K. (2003): Effects of phytosterols on zebrafish reproduction in multigeneration test. *Environ Pollut*, 123(2): 267-273.
- Nam C., Woo G.H., Uetsuka K., Nakayama H., Doi K. (2006): Histopathological changes in the brain of mouse fetuses by etoposide-administration. *Histol Histopathol*, 21(3): 257-263.
- Negreira N., Mastroianni N., Lopez de Alda M., Barcelo D. (2013a): Multianalyte determination of 24 cytostatics and metabolites by liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry and study of their stability and optimum storage conditions in aqueous solution. *Talanta*, 116: 290-299.
- Negreira N., Lopez de Alda M., Barcelo D. (2013b): On-line solid phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of 17 cytostatics and metabolites in waste, surface and ground water samples. *J Chromatogr A*, 1280: 64-74.
- Negreira N., Lopez de Alda M., Barcelo D. (2014): Study of the stability of 26 cytostatic drugs and metabolites in wastewater under different conditions. *Sci Total Environ*, 482-483: 389-398.
- Nikolova Z., Peng B., Hubert M., Sieberling M., Keller U., Ho Y.Y., Schran H., Capdeville R. (2004): Bioequivalence, safety, and tolerability of imatinib tablets compared with capsules. *Cancer Chemother Pharmacol*, 53(5): 433-438.
- Novartis (2015): GLEEVEC® (imatinib mesylate) (Important safety information). https://www.pharma.us.novartis.com/product/pi/pdf/gleevec_tabs.pdf, 8.1.
- Nunes B., Carvalho F., Guilhermino L. (2004): Acute and chronic effects of clofibrate and clofibric acid on the enzymes acetylcholinesterase, lactate dehydrogenase and catalase of the mosquitofish, *Gambusia holbrooki*. *Chemosphere*, 57(11): 1581-1589.
- Nurmio M., Kallio J., Toppari J., Jahnukainen K. (2008): Adult reproductive functions after early postnatal inhibition by imatinib of the two receptor tyrosine kinases, c-kit and PDGFR, in the rat testis. *Reprod Toxicol*, 25(4): 442-446.
- OECD (1992a): Test No. 203: Fish, Acute Toxicity Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. OECD Publishing, Paris, France,.
- OECD (1992b): Test No. 210: Fish, Early-Life Stage Toxicity Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. OECD Publishing, Paris, France,.
- OECD (1998): Test No. 212: Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-Fry Stages, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. OECD Publishing, Paris, France.
- OECD (2006): Fish Embryo Toxicity (FET) Test Fish Embryo Toxicity (FET) Test, OECD Guideline for the Testing of Chemicals, Draft Proposal for a New Guideline. OECD Publishing, Paris.
- OECD (2009): Test No. 230: 21-day Fish Assay, OECD Publishing.
- OECD (2011): Test No. 234: Fish Sexual Development Test, OECD Publishing.
- OECD (2012): Test No. 229: Fish Short Term Reproduction Assay, OECD Publishing.

- OECD (2013a): Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. OECD Publishing, Paris, France.
- OECD (2013b): Test No. 210: Fish, Early-life Stage Toxicity Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. OECD Publishing, Paris, France.
- OECD (2015): Test No. 240: Medaka Extended One Generation Reproduction Test (MEOGRT), O.ECD Publishing.
- Olas B., Wachowicz B. (1996): [Selenium in the cytotoxicity of cisplatin]. *Postepy higieny i medycyny doswiadczalnej*, 51(1): 95-108.
- Ou H.C., Raible D.W., Rubel E.W. (2007): Cisplatin-induced hair cell loss in zebrafish (*Danio rerio*) lateral line. *Hear Res*, 233(1-2): 46-53.
- Pack M., Solnica-Krezel L., Malicki J., Neuhauss S.C., Schier A.F., Stemple D.L., Driever W., Fishman M.C. (1996): Mutations affecting development of zebrafish digestive organs. *Development*, 123: 321-328.
- Padilla S., Corum D., Padnos B., Hunter D.L., Beam A., Houck K.A., Sipes N., Kleinstreuer N., Knudsen T., Dix D.J., Reif D.M. (2012): Zebrafish developmental screening of the ToxCast™ Phase I chemical library. *Reproductive Toxicology*, 33(2): 174-187.
- Parichy D.M., Elizondo M.R., Mills M.G., Gordon T.N., Engeszer R.E. (2009): Normal table of postembryonic zebrafish development: staging by externally visible anatomy of the living fish. *Dev Dyn*, 238(12): 2975-3015.
- Parnig C., Seng W.L., Semino C., McGrath P. (2002): Zebrafish: a preclinical model for drug screening. *Assay Drug Dev Technol*, 1(1 Pt 1): 41-48.
- Parrella A., Kundi M., Lavorgna M., Criscuolo E., Russo C., Isidori M. (2014a): Toxicity of exposure to binary mixtures of four anti-neoplastic drugs in *Daphnia magna* and *Ceriodaphnia dubia*. *Aquat Toxicol*, 157: 41-46.
- Parrella A., Lavorgna M., Criscuolo E., Russo C., Fiumano V., Isidori M. (2014b): Acute and chronic toxicity of six anticancer drugs on rotifers and crustaceans. *Chemosphere*, 115: 59-66.
- Pérez-Estrada L.A., Malato S., Agüera A., Fernández-Alba A.R. (2007): Degradation of dipyrone and its main intermediates by solar AOPs: Identification of intermediate products and toxicity assessment. *Catalysis Today*, 129(1-2): 207-214.
- Perkins E.J., Ankley G.T., Crofton K.M., Garcia-Reyero N., LaLone C.A., Johnson M.S., Tietge J.E., Villeneuve D.L. (2013): Current perspectives on the use of alternative species in human health and ecological hazard assessments. *Environ Health Perspect*, 121(9): 1002-1010.
- Peterka M., Mandys V., Viale M., Cafaggi S., Peterkova R., Esposito M. (2002): Embryotoxicity of cisplatin and a cisplatin-procaine complex (DPR) studied in chick embryo. *Neoplasma*, 49(6): 394-400.
- Phillips J.B., Westerfield M. (2014): Zebrafish models in translational research: tipping the scales toward advancements in human health. *Disease Models & Mechanisms*, 7(7): 739.

- Pichler C., Filipic M., Kundi M., Rainer B., Knasmueller S., Misik M. (2014): Assessment of genotoxicity and acute toxic effect of the imatinib mesylate in plant bioassays. *Chemosphere*, 115: 54-58.
- Pommier Y. (2013): Drugging topoisomerases: lessons and challenges. *ACS Chem Biol*, 8(1): 82-95.
- Raloff J. (1998): Drugged waters: Does it matter that pharmaceuticals are turning up in water supplies? *Science News*, 153(12): 187-189.
- Ramalingam S., Lagattuta T.F., Egorin M.J., Hayes M.J., Ramanathan R.K. (2004): Biliary excretion of imatinib mesylate and its metabolite CGP 74588 in humans. *Pharmacotherapy*, 24(9): 1232-1235.
- Ravina M., Campanella L., Kiwi J. (2002): Accelerated mineralization of the drug Diclofenac via Fenton reactions in a concentric photo-reactor. *Water Res*, 36(14): 3553-3560.
- Reddel R.R., Kefford R.F., Grant J.M., Coates A.S., Fox R.M., Tattersall M.H. (1982): Ototoxicity in patients receiving cisplatin: importance of dose and method of drug administration. *Cancer Treat Rep*, 66(1): 19-23.
- Reed E. (1998): Platinum-DNA adduct, nucleotide excision repair and platinum based anti-cancer chemotherapy. *Cancer Treat Rev*, 24(5): 331-344.
- Ricci M., Fifi A., Ragni A., Schlechtriem C., Focken U. (2003): Development of a low-cost technology for mass production of the free-living nematode *Panagrellus redivivus* as an alternative live food for first feeding fish larvae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60(5): 556-559.
- Roberts P.H., Thomas K.V. (2006): The occurrence of selected pharmaceuticals in wastewater effluent and surface waters of the lower Tyne catchment. *Science of The Total Environment*, 356(1-3): 143-153.
- Robinson A.A., Belden J.B., Lydy M.J. (2005): Toxicity of fluoroquinolone antibiotics to aquatic organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24(2): 423-430.
- Rosenberg B., VanCamp L., Trosko J.E., Mansour V.H. (1969): Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. *Nature*, 222(5191): 385-386.
- Routledge E.J., Sheahan D., Desbrow C., Brighty G.C., Waldock M., Sumpter J.P. (1998): Identification of Estrogenic Chemicals in STW Effluent. 2. In Vivo Responses in Trout and Roach. *Environmental Science & Technology*, 32(11): 1559-1565.
- Rowney N.C., Johnson A.C., Williams R.J. (2009): Cytotoxic drugs in drinking water: A prediction and risk assessment exercise for the thames catchment in the United Kingdom. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28(12): 2733-2743.
- Russell W.M.S., Burch R.L. (1959). *The principles of humane experimental technique*, Methuen, London.

- Saravanan M., Hur J.H., Arul N., Ramesh M. (2014): Toxicological effects of clofibrac acid and diclofenac on plasma thyroid hormones of an Indian major carp, *Cirrhinus mrigala* during short and long-term exposures. *Environ Toxicol Pharmacol*, 38(3): 948-958.
- Saravanan M., Karthika S., Malarvizhi A., Ramesh M. (2011): Ecotoxicological impacts of clofibrac acid and diclofenac in common carp (*Cyprinus carpio*) fingerlings: Hematological, biochemical, ionoregulatory and enzymological responses. *J Hazard Mater*, 195: 188-194.
- Saravanan M., Ramesh M. (2013): Short and long-term effects of clofibrac acid and diclofenac on certain biochemical and ionoregulatory responses in an Indian major carp, *Cirrhinus mrigala*. *Chemosphere*, 93(2): 388-396.
- Sawant M., Zhang S., Li L. (2001): Effect of salinity on development of zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Current science*, 81(10): 1347-1349.
- Schartl M. (2004): A comparative view on sex determination in medaka. *Mechanisms of Development*, 121(7-8): 639-645.
- Schlechtriem C., Ricci M., Focken U., Becker K. (2004): The suitability of the free-living nematode *Panagrellus redivivus* as live food for first-feeding fish larvae. *Journal of Applied Ichthyology*, 20(3): 161-168.
- Scholz S., Fischer S., Gundel U., Kuster E., Luckenbach T., Voelker D. (2008): The zebrafish embryo model in environmental risk assessment--applications beyond acute toxicity testing. *Environ Sci Pollut Res Int*, 15(5): 394-404.
- Schuetz J.D., Wallace H.J., Diasio R.B. (1984): 5-Fluorouracil incorporation into DNA of CF-1 mouse bone marrow cells as a possible mechanism of toxicity. *Cancer Res*, 44(4): 1358-1363.
- Schultz I.R., Hayton W.L. (1997): Influence of body fat on trifluralin toxicokinetics in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16(5): 997-1001.
- Schwaiger J., Ferling H., Mallow U., Wintermayr H., Negele R.D. (2004): Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac: Part I: histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout. *Aquatic Toxicology*, 68(2): 141-150.
- Seki M., Yokota H., Matsubara H., Maeda M., Tadokoro H., Kobayashi K. (2003): Fish full life-cycle testing for the weak estrogen 4-tert-pentylphenol on medaka (*Oryzias latipes*). *Environ Toxicol Chem*, 22(7): 1487-1496.
- Seki M., Yokota H., Matsubara H., Maeda M., Tadokoro H., Kobayashi K. (2004): Fish full life-cycle testing for androgen methyltestosterone on medaka (*Oryzias latipes*). *Environ Toxicol Chem*, 23(3): 774-781.
- Selman K., Wallace R.A. (1989): Cellular aspects of oocyte growth in teleosts. *Zoological Science*, 6(2): 211-231.
- Sergi B., Fetoni A., Ferraresi A., Troiani D., Azzena G., Paludetti G., Maurizi M. (2004): The role of antioxidants in protection from ototoxic drugs. *Acta Oto-Laryngologica*, 124(sup552): 42-45.

Shibuya H., Kato Y., Saito M., Isobe T., Tsuboi R., Koga M., Toyota H., Mizuguchi J. (2003): Induction of apoptosis and/or necrosis following exposure to antitumour agents in a melanoma cell line, probably through modulation of Bcl-2 family proteins. *Melanoma Res*, 13(5): 457-464.

Shore L.S., Gurevitz M., Shemesh M. (1993): Estrogen as an environmental pollutant. *Bull Environ Contam Toxicol*, 51(3): 361-366.

Shuey D.L., Zucker R.M., Elstein K.H., Rogers J.M. (1994): Fetal anemia following maternal exposure to 5-fluorouracil in the rat. *Teratology*, 49(4): 311-319.

Siddiqui K., Del Valle L., Morellet N., Cui J., Ghafouri M., Mukerjee R., Urbanska K., Fan S., Pattillo C., Deshmane S. (2008): Molecular mimicry in inducing DNA damage between HIV-1 Vpr and the anticancer agent, cisplatin. *Oncogene*, 27(1): 32-43.

Sieber S.M., Whang-Peng J., Botkin C., Knutsen T. (1978): Teratogenic and cytogenetic effects of some plant-derived antitumor agents (vincristine, colchicine, maytansine, VP-16-213 and VM-26) in mice. *Teratology*, 18(1): 31-47.

Smith M., Kimmel G., Kochhar D., Shepard T., Spielberg S., Wilson J. (1983): A selection of candidate compounds for in vitro teratogenesis test validation. *Teratogenesis, carcinogenesis, and mutagenesis*, 3(6): 461-480.

Soares J., Coimbra A., Reis-Henriques M., Monteiro N., Vieira M., Oliveira J., Guedes-Dias P., Fontainhas-Fernandes A., Parra S.S., Carvalho A. (2009): Disruption of zebrafish (*Danio rerio*) embryonic development after full life-cycle parental exposure to low levels of ethinylestradiol. *Aquatic Toxicology*, 95(4): 330-338.

Sowers A.D., Gaworecki K.M., Mills M.A., Roberts A.P., Klaine S.J. (2009): Developmental effects of a municipal wastewater effluent on two generations of the fathead minnow, *Pimephales promelas*. *Aquat Toxicol*, 95(3): 173-181.

Spence R., Gerlach G., Lawrence C., Smith C. (2008): The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 83(1): 13-34.

Stan H., Heberer T. (1997): Pharmaceuticals in the aquatic environment: Water analysis. *Analisis*, 25(7): M20-M23.

Stancova V., Plhalova L., Bartoskova M., Zivna D., Prokes M., Marsalek P., Blahova J., Skoric M., Svobodova Z. (2014): Effects of Mixture of Pharmaceuticals on Early Life Stages of Tench (*Tinca tinca*). *BioMed Research International*, 2014: 10.

Steger-Hartmann T., Kümmerer K., Hartmann A. (1997): Biological Degradation of Cyclophosphamide and Its Occurrence in Sewage Water. *Ecotoxicology and environmental safety*, 36(2): 174-179.

Steger-Hartmann T., Länge R., Schweinfurth H. (1998): Umweltverhalten und ökotoxikologische Bewertung von iodhaltigen Röntgenkontrastmitteln (Environmental fate and ecotoxicological assessment of iodinated X-ray contrast media). *Vom Wasser*, 91: 185.194.

Strähle U., Scholz S., Geisler R., Greiner P., Hollert H., Rastegar S., Schumacher A., Selderslaghs I., Weiss C., Witters H., Braunbeck T. (2012): Zebrafish embryos as an alternative

to animal experiments—A commentary on the definition of the onset of protected life stages in animal welfare regulations. *Reproductive Toxicology*, 33(2): 128-132.

Straub J.O. (2010a): Combined environmental risk assessment for 5-fluorouracil and capecitabine in Europe. *Integr Environ Assess Manag*, 6 Suppl: 540-566.

Straub J.O. (2010b): Protein and Peptide Therapeutics: An Example of “Benign by Nature” Active Pharmaceutical Ingredients. Green and Sustainable Pharmacy. Kümmerer, K. and Hempel, M. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg: 127-133.

Stumpf M., Ternes T.A., Wilken R.-D., Silvana Vianna R., Baumann W. (1999): Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Science of The Total Environment*, 225(1–2): 135-141.

Tauer J.T., Hofbauer L.C., Jung R., Gerdes S., Glauche I., Erben R.G., Suttrop M. (2015): Impact of Long-Term Exposure to the Tyrosine Kinase Inhibitor Imatinib on the Skeleton of Growing Rats. *PLoS ONE*, 10(6): e0131192.

Ternes T.A. (1998): Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers1. *Water Res*, 32(11): 3245-3260.

Ternes T.A., Hirsch R. (2000): Occurrence and Behavior of X-ray Contrast Media in Sewage Facilities and the Aquatic Environment. *Environmental Science & Technology*, 34(13): 2741-2748.

Thorpe K.L., Gross-Sorokin M., Johnson I., Brighty G., Tyler C.R. (2005): An Assessment of the Model of Concentration Addition for Predicting the Estrogenic Activity of Chemical Mixtures in Wastewater Treatment Works Effluents. *Environmental Health Perspectives*, 114(S-1): 90-97.

Tixier C., Singer H.P., Oellers S., Müller S.R. (2003): Occurrence and Fate of Carbamazepine, Clofibric Acid, Diclofenac, Ibuprofen, Ketoprofen, and Naproxen in Surface Waters. *Environmental Science & Technology*, 37(6): 1061-1068.

Toolaram A.P., Kümmerer K., Schneider M. (2014): Environmental risk assessment of anti-cancer drugs and their transformation products: A focus on their genotoxicity characterization-state of knowledge and short comings. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 760: 18-35.

Trautwein C., Kümmerer K., Metzger J.W. (2008): Aerobic biodegradability of the calcium channel antagonist verapamil and identification of a microbial dead-end transformation product studied by LC–MS/MS. *Chemosphere*, 72(3): 442-450.

Triebkorn R., Casper H., Scheil V., Schwaiger J. (2007): Ultrastructural effects of pharmaceuticals (carbamazepine, clofibric acid, metoprolol, diclofenac) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and common carp (*Cyprinus carpio*). *Anal Bioanal Chem*, 387(4): 1405-1416.

Vajda A.M., Barber L.B., Gray J.L., Lopez E.M., Woodling J.D., Norris D.O. (2008): Reproductive disruption in fish downstream from an estrogenic wastewater effluent. *Environmental Science & Technology*, 42(9): 3407-3414.

van den Brandhof E.J., Montforts M. (2010): Fish embryo toxicity of carbamazepine, diclofenac and metoprolol. *Ecotoxicol Environ Saf*, 73(8): 1862-1866.

Van Leeuwen C.J., Van Der Zandt P.T.J., Aldenberg T., Verhaar H.J.M., Hermens J.L.M. (1992): Application of QSARs, extrapolation and equilibrium partitioning in aquatic effects assessment. I. Narcotic industrial pollutants. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 11(2): 267-282.

Van Loon W.M.G.M., Verwoerd M.E., Wijnker F.G., van Leeuwen C.J., van Duyn P., van deGuchte C., Hermens J.L.M. (1997): Estimating total body residues and baseline toxicity of complex organic mixtures in effluents and surface waters. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16(7): 1358-1365.

Vasskog T., Anderssen T., Pedersen-Bjergaard S., Kallenborn R., Jensen E. (2008): Occurrence of selective serotonin reuptake inhibitors in sewage and receiving waters at Spitsbergen and in Norway. *Journal of Chromatography A*, 1185(2): 194-205.

Velagaleti R. (1997): Behavior of Pharmaceutical Drugs (Human and Animal Health) in the Environment. *Drug Information Journal*, 31(3): 715-722.

Veneri D., Franchini M., Bonora E. (2005): Imatinib and regression of type 2 diabetes. *New England Journal of Medicine*, 352(10): 1049-1050.

Verhaar H.J.M., van Leeuwen C.J., Hermens J.L.M. (1992): Classifying environmental pollutants. *Chemosphere*, 25(4): 471-491.

VICH (2004): The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products: environmental impact assessment for veterinary medicinal products. Phase II guidance. VICH Topic GL 38 (Ecotoxicity Phase II) Step 7 (CVMP/VICH/790/03-Final).

Villeneuve D., Volz D.C., Embry M.R., Ankley G.T., Belanger S.E., Léonard M., Schirmer K., Tanguay R., Truong L., Wehmas L. (2014): Investigating alternatives to the fish early-life stage test: A strategy for discovering and annotating adverse outcome pathways for early fish development. *Environ Toxicol Chem*, 33(1): 158-169.

Vodicnik M.J., Peterson R.E. (1985): The enhancing effect of spawning on elimination of a persistent polychlorinated biphenyl from female yellow perch. *Toxicological Sciences*, 5(4): 770-776.

Vom Saal F.S., Timms B.G., Montano M.M., Palanza P., Thayer K.A., Nagel S.C., Dhar M.D., Ganjam V., Parmigiani S., Welshons W.V. (1997): Prostate enlargement in mice due to fetal exposure to low doses of estradiol or diethylstilbestrol and opposite effects at high doses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(5): 2056-2061.

Watanabe H., Tamura I., Abe R., Takanobu H., Nakamura A., Suzuki T., Hirose A., Nishimura T., Tatarazako N. (2016): Chronic toxicity of an environmentally relevant mixture of pharmaceuticals to three aquatic organisms (alga, daphnid, and fish). *Environ Toxicol Chem*, 35(4): 996-1006.

Watts S.A., Powell M., D'Abramo L.R. (2012): Fundamental Approaches to the Study of Zebrafish Nutrition. *ILAR journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources*, 53(2): 144-160.

- Wedekind C. (2014): Fish populations surviving estrogen pollution. *BMC Biology*, 12(1): 10.
- Wedekind C., von Siebenthal B., Gingold R. (2007): The weaker points of fish acute toxicity tests and how tests on embryos can solve some issues. *Environmental Pollution*, 148(2): 385-389.
- Westerfield M. (1995): *The Zebrafish Book. A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Danio rerio)*. Eugene, OR, USA, University of Oregon Press.
- Winn R.N. (2001): Transgenic fish as models in environmental toxicology. *Ilar j*, 42(4): 322-329.
- Xie H. (2012): Occurrence, ecotoxicology, and treatment of anticancer agents as water contaminants. *Journal of Environmental & Analytical Toxicology*, 2012.
- Yamashita N., Yasojima M., Nakada N., Miyajima K., Komori K., Suzuki Y., Tanaka H. (2006): Effects of antibacterial agents, levofloxacin and clarithromycin, on aquatic organisms. *Water Science and Technology*, 53(11): 65-72.
- Yin J., Shao B., Zhang J., Li K. (2009): A Preliminary Study on the Occurrence of Cytostatic Drugs in Hospital Effluents in Beijing, China. *Bull Environ Contam Toxicol*, 84(1): 39.
- Yin J., Shao B., Zhang J., Li K. (2010): A preliminary study on the occurrence of cytostatic drugs in hospital effluents in Beijing, China. *Bull Environ Contam Toxicol*, 84(1): 39-45.
- Zeliger H.I. (2008): 2 - Health Effects of Exposures to Chemical Mixtures. *Human Toxicology of Chemical Mixtures*. Zeliger, H. I. Norwich, NY, William Andrew Publishing: 7-15.
- Zhang J., Chang V.W.C., Giannis A., Wang J.-Y. (2013): Removal of cytostatic drugs from aquatic environment: A review. *Science of The Total Environment*, 445-446: 281-298.
- Zimmermann J., Buchdunger E., Mett H., Meyer T., Lydon N.B. (1997): Potent and selective inhibitors of the Abl-kinase: phenylamino-pyrimidine (PAP) derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 7(2): 187-192.
- Zon L.I., Le X. (2008): Potential of zebrafish for anticancer drug screening. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 3(12): 1451-1460.
- Zon L.I., Peterson R.T. (2005): In vivo drug discovery in the zebrafish. *Nat Rev Drug Discov*, 4(1): 35-44.
- Zoukova R., Odraska P., Dolezalova L., Hilscherova K., Marsalek B., Blaha L. (2007): Ecotoxicity and genotoxicity assessment of cytostatic pharmaceuticals. *Environ Toxicol Chem*, 26(10): 2208-2214.
- Zuccato E., Calamari D., Natangelo M., Fanelli R. (2000): Presence of therapeutic drugs in the environment. *The Lancet*, 355(9217): 1789-1790.
- Zuccato E., Castiglioni S., Fanelli R. (2005a): Identification of the pharmaceuticals for human use contaminating the Italian aquatic environment. *J Hazard Mater*, 122(3): 205-209.

Zuccato E., Chiabrando C., Castiglioni S., Calamari D., Bagnati R., Schiarea S., Fanelli R. (2005b): Cocaine in surface waters: a new evidence-based tool to monitor community drug abuse. *Environmental Health*, 4: 14-14.

Zühlke S., Dünnbier U., Heberer T. (2004): Detection and identification of phenazone-type drugs and their microbial metabolites in ground and drinking water applying solid-phase extraction and gas chromatography with mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, 1050(2): 201-209.

9.2 M2 Táblázatok

1. táblázat Az 5-FU kezelt F1 generáció szaporításának eredményei

A táblázatban az egyes szaporítások során kapott normalizált ikraszám látható. A negyedik szaporítás során kapott ikraszámot nem tüntettem fel a táblázatban, mivel itt minden csoport esetében jelentősen csökkent a leadott ikra mennyisége. A kapott eredmények alapján látható, hogy a második szaporításhoz képest a kontrol és a három 5-FU-val kezelt csoportnál a többi szaporításban kevesebb ikrát adtak a nőstények, míg a DMSO-val kezelt kontrol csoport esetében az ikraszám nőtt. A rossz ikraszemek esetében az ötödik szaporítás alkalmával találtam az 5-FU-val kezelt csoportokban a legtöbb ilyen ikraszemet. A kontrolhoz képest az 1 µg/l-es kezelésnél ez a különbség szignifikánsan nagyobb volt (Kruskal-Wallis. Dunns teszt. $p \leq 0,05$).

	1, szaporítás		2, szaporítás		3, szaporítás		5, szaporítás	
	Termékenyült ikraszem	Nem term. ikraszem	Termékenyült ikraszem	Nem term. ikraszem	Termékenyült ikraszem	Nem term. ikraszem	Termékenyült ikraszem	Nem term. ikraszem
Kontrol	30,38±27,89	0,6±1,2	21,6±15,33	0,0±0,0	19,5±14,76	0,53±0,58	16,32±14,33	0,05±0,16
DMSO	13,1±20,11	0,15±0,47	39,28±18,45	0,0±0,0	40,92±16,65	0,98±1,02	45,15±17,18	0,12±0,19
10 ng/l 5-FU	20,43±16,6	0,0±0,0	38,43±18,08	0,0±0,0	20,7±18,9	0,08±0,18	15,25±11,66	0,65±0,81
1 µg/l 5-FU	12,38±14,53	0,0±0,0	41,67±25,8	1,167±2,41	36,13±20,42	1,19±1,08	35,87±21,63	3,47±2,13*
1 µg/l 5-FU	30,4±26,97	0,0±0,0	35±22,46	0,0±0,0	15,25±15,33	0,37±0,51	21,13±14,76	0,83±0,74

2. táblázat Az IM kezelt F1 generáció szaporításának eredményei

A táblázatban az egyes szaporítások során kapott normalizált ikraszám látható. Megfigyelhető volt, hogy bár a kontrol csoportokban a halak átlagosan több ikrát adtak kevesebb rossz ikraszemmel, azonban ez a különbség nem volt statisztikailag igazolható. A termékenyült ikraszemek száma egyedül az első szaporításban volt szignifikánsan több, mint a 10 ng/l-es csoporté (Kruskal-Wallis teszt, $p \leq 0,05$).

	1, szaporítás		2, szaporítás		3, szaporítás		4, szaporítás		5, szaporítás		6, szaporítás		7, szaporítás		8, szaporítás		9, szaporítás	
	Term. ikra	Nem term. ikra	Term. ikra	Nem term. ikra	Term. ikra	Nem term. ikra	Term. ikra	Nem term. ikra	Term. ikra	Nem term. ikra	Term. ikra	Nem term. ikra	Term. ikra	Nem term. ikra	Term. ikra	Nem term. ikra	Term. ikra	Nem term. ikra
Kontrol	76,83± 20,35	0,67± 0,62	86,75± 32,03	1,25± 1,66	71,44± 24,76	1,17± 1,74	74,27± 29,64	0,53± 0,69	35,0± 23,52	0,5± 0,59	34,08± 23,71	1,33± 1,19	64,17± 47,71	0,11± 0,17	37,2± 25,36	1,8± 1,64	67,36± 40,99	0,23± 0,47
10 ng/l IM	20,13± 23,97*	5,07± 5,77	57,72± 43,93	4,28± 5,79	38,73± 29,58	1,13± 0,69	67,44± 30,99	2,94± 5,76	43,67± 31,81	0,0± 0,0	34,5± 20,67	0,28± 0,44	76,72± 76,86	0,5± 0,75	34,89± 13,12	0,22± 0,27	60,52± 28,10	0,09± 0,20
1 µg/l IM	37,53± 16,29	6,36± 8,22	25,5± 7,94	0,0± 0,0	46,63± 22,41	1,08± 1,95	73,94± 46,78	1,0± 1,33	36,13± 19,88	0,2± 0,3	33,27± 18,88	0,73± 0,76	37,58± 29,12	3,83± 7,22	46,4± 34,35	1,73± 1,86	88,5± 40,71	0,08± 0,20
1 µg/l IM	22,27± 27,46	3,07± 3,85	54,53± 35,35	0,61± 1,18	41,11± 24,69	0,44± 0,50	99,67± 66,22	1,0± 0,89	45,0± 19,35	0,6± 0,43	32,94± 19,27	0,06± 0,14	37,11± 15,5	0,17± 0,18	39,39± 25,56	0,06± 0,14	49,45± 21,27	0,15± 0,34

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Nagyon sok embernek szeretném megköszönni a hosszú évek alatt, a munkám elkészítéséhez nyújtott segítségét. Elsőkét szeretném megköszönni a segítséget témavezetőimnek, Dr. Urbányi Bélának, aki végig támogatott a munkám során és Dr. Csenki-Bakos Zsoltnak, akitől a zebrázást tanulhattam és akihez mindig bátran fordulhattam tanácsért.

Szeretném megköszönni a Halgazdálkodási Tanszék valamennyi kollégájának a sok segítséget és támogatást. Külön ki kell emelnem azokat a remek kollégákat Bencsik Dórát, Reining Mártát, Garai Edinát, Csepeli Andreát és hallgatókat Varga Lillát, valamint Tarcai Zsoltot, akikkel a zebrás laborban dolgozhattam együtt. Köszönöm nekik a hosszú távú tesztekbe fektetett sok munkájukat, nélkülük nem sikerülhettek volna ezek a vizsgálatok. Köszönöm Dr. Ferincz Árpádnak és Dr. Ács Andrásnak a sok hasznos tanácsot. Szeretném külön megköszönni Gazsi Gyöngyinek azt a sok segítséget, amit a vizsgálataim elvégzéséhez nyújtott.

Köszönettel tartozom Dr. Baska Ferencnek a sok tanácsért és a szövettani minták kiértékeléséhez nyújtott segítségéért.

A doktori munkám során számos csodás külföldi kollégával is együtt dolgozhattam, mint Dr. Metka Filipič, Dr. Marina Isidori, Prof. Siegfried Knasmüller, Dr. Miren López de Alda, Prof. Verica Garaj Vrhovac, Dr. Goran Gajski, Matjaž Novak, Dr. Zoran Gačić, akik sokat segítettek a kísérletek tervezése és kiértékelése során. Szeretném megköszönni Dr. Stefan Scholz-nak a sok tanácsot, amikkel a lipcei tanulmányútjaim során ellátott.

Szeretném megköszönni barátaimnak Kovács Attilának, Varga Andrásnak, Béres Györgynek, Viszok Mihálynak, Pesti Balázsnak és Schally Gergőnek az évek során nyújtott támogatásukat és a sok ösztönzést.

Végezetül szeretném megköszönni családomnak azt a rengetek támogatását és áldozatot, amit értem hoztak. Köszönöm nagyszüleimnek, különösen nagyapámnak, Hesz Ferencnek a sok biztatást és bátorítást. Köszönöm szüleimnek és húgomnak, hogy mindig támaszkodhatok rájuk. Mindenek felett köszönöm feleségemnek, Kovács-Szász Beátának és kislányomnak Borókának, hogy mellettem álltak és nap mint nap segítették a munkám elkészültét.

A dolgozat a CytoThreat FP7 265264 projekt keretében jött létre.