

Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar

Gyógyszertani és Méregtani Tanszék

**A szulfametoxazol és a ketoprofen toxikus hatása az afrikai
karmosbéka (*Xenopus laevis*, Daudin 1802) lárváira**

TDK dolgozat

Készítette: Nagyová Anabela

IV. évfolyam

Témavezető: Dr. Lehel József

egyetemi docens

Dr. Baska Ferenc

egyetemi docens

Budapest

2011

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	2
1. BEVEZETÉS.....	3
2. IRODALMI ÖSSZEFOGLALÓ.....	4
2.1. A TOXIKOLÓGIA MÓDSZERTANÁNAK IRODALMA.....	4
2.1.1. Biztonságos gyógyszerek kutatása.....	4
2.1.2. Ökotoxikológia, kísérleti- és tesztállatok	4
2.2. AZ AFRIKAI KARMOSBÉKA (<i>XENOPUS LAEVIS</i>) IRODALMA	5
2.2.1. A tudományban elfoglalt helye.....	5
2.2.2. Előnyök és hátrányok	5
2.2.3. Elterjedés és élettér	5
2.2.4. Külső megjelenés	6
2.2.5. Laboratóriumi tartásmód.....	6
2.3. A SZULFAMETOXAZOL IRODALMA	6
2.4. A KETOPROFEN IRODALMA	8
2.5. A TERATOGÉN HATÓANYAGOK IRODALMA.....	9
2.5.1. A szulfametoxazol toxicitásának irodalma.....	9
2.5.2. A ketoprofen toxicitásának irodalma.....	10
3. ANYAG ÉS MÓDSZER.....	12
3.1. FELHASZNÁLT VEGYÜLETEK.....	12
3.1.1. Szulfametoxazol	12
3.1.2. Ketoprofen.....	12
3.2. A FETAX (FROG EMBRYO TERATOGENESIS ASSAY- <i>XENOPUS</i>)-MÓDSZER.....	12
3.2.1. A szülőpárok kezelése és elhelyezése.....	13
3.2.2. A peték csoportosítása és kezelése.....	15
3.2.3. Kiértékelés	15
3.2.4. Az adatok statisztikai elemzése.....	16
4. EREDMÉNYEK.....	18
5. MEGBESZÉLÉS.....	26
5.1. A 96 ÓRÁS FETAX TESZT HÁTRÁNYAI, HIBÁI.....	29
6. ÖSSZEFOGLALÁS	31
7. SUMMARY	32
8. IRODALOMJEGYZÉK.....	33
9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	38

Rövidítések jegyzéke

ANOVA	varianciaanalízis, (Analysis of Variance)
ASTM	Amerikai Anyagvizsgálati Társaság (American Society for Testing and Materials)
COX-1	ciklooxygenáz-1
COX-2	ciklooxygenáz-2
D	kétfejűség
E	szemfejlődési rendellenességek
EC ₁₀ , EC ₅₀	hatásos koncentráció (Effect Concentration), mely a mérési vagy vizsgálati végpont 10 vagy 50%-os csökkenését okozza
ELTE	Eötvös Loránd Tudományegyetem
F	arcorri tájék deformációi
FETAX	békaembrióval végzett teratogenitási gyorsteszt (Frog Embryo Teratogenesis Assay-Xenopus)
G	bélfejlődési rendellenességek
hCG	humán choriogonadotropin
IgG	immunglobulin G
KPF	ketoprofen
LC ₁₀ , LC ₅₀	letális koncentráció (Lethal Concentration), mely a tesztorganizmus 10 vagy 50%-ának pusztulását okozza
MCIG	a legalacsonyabb koncentráció, mely a lárvák növekedési gátlását okozza (Minimal Concentration Inhibiting Growth)
NE	nemzetközi egység
OECD	Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet (Organisation for Economic Co-operation and Development)
P	pigmentképzési rendellenességek
PABA	para-amino-benzoésav
RATL	hüllők és kétéltűek toxikológiai irodalmának adatbázisa (A Database of Reptile and Amphibian Toxicology Literature)
SMX	szulfametoxazol
SMX-NO	nitrozo-szulfametoxazol
TI	teratogenitási index
US EPA	az USA Környezetvédelmi Ügynöksége (United States Environmental Protection Agency)

1. BEVEZETÉS

Az utóbbi évtizedekben világszerte jelentősen növekedett a gyógyszer- és vegyszeriparban használt különböző potenciálisan teratogén tulajdonságú vegyületek, hatóanyagok száma. Munkámban az ilyen tulajdonsággal is bíró két hatóanyag, a szulfametoxazol és a ketoprofen, élő szervezetben kifejtett káros hatását vizsgáltuk.

A teratogenitási vizsgálatok rövid múltra tekintenek vissza. Az 1957-1961 között forgalmazott, a terhes nők reggeli rosszullétet csillapító szer (Contergan: S-thalidomid) váratlan teratogén hatása terelte a tudományt a torzképző hatások alapos tanulmányozásának irányába. A családi tragédiákhoz vezető botrány óta kötelező a gerinctelen (pörgekarúak) és gerinces állatokon (halak, kételtűek, nyúl, patkány, majom) elvégzett teratogenitási kísérletek kivitelezése (Cook - Fairweather, 1968). A 3R-szabály (Replacement=helyettesítés, Reduction=csökkentés, Refinement=finomítás) térhódításával előtérbe került a gerinces állatokon végzendő vizsgálatok kiváltása alacsonyabb rendű modellrendszerekkel és alternatív módszerekkel. Napjainkban így jut szerephez az afrikai karmosbéka (*Xenopus laevis*), mint egy ideális tesztállat. A munkámban bemutatott kísérleteket a zebradánió (*Brachydanio rerio*) lárvákon is elvégeztük, de ezeket az eredményeket később szándékozzuk közölni egy publikációban.

A Brünni Állatorvos-tudományi és Gyógyszerészeti Egyetem Közegészségügyi és Toxikológiai Intézetének laborprofiljában szereplő öko- és klinikotoxikológiai vizsgálatok része volt a továbbiakban tárgyalt kísérlet. Az intézetben töltött nyári önkéntes kutatói munka során döntöttem úgy, hogy az itt leírt kísérletet a TDK munkám témájául választom.

Könnyen belátható, hogy a sikeres teszt- és kísérleti eredmények birtokában a címben megjelölt hatóanyagok használata biztonságosabb és hatékonyabb lesz a gyógyászatban, és reméljük, hogy eredményeink hozzájárulnak akár az élelmiszerbiztonság kérdéseéhez is.

2. IRODALMI ÖSSZEFOGLALÓ

2.1. A toxikológia módszertanának irodalma

2.1.1. Biztonságos gyógyszerek kutatása

A gyógyszer- és vegyipar által előállított anyagok biztonságát, illetve azok teratogén hatásának kutatását már a múlt században elkezdték. A gyógyszerbiztonság és a hatóanyagok teratogenitást okozó potenciáljának fogalmaival már az 1930-as években is foglalkoztak, amikor a vemhes sertések A-vitamin hiányos diéta okozta ellés utáni magzati fejlődési rendellenességeket írtak le (Sommer, 2008).

Az 1957-1961 között forgalmazott, terhes anyák reggeli rosszullétét csillapító szer (Contergan: S-thalidomid) okozta botrány után egyértelművé vált a gyógyszerek lehetséges teratogén hatásának vizsgálata és azok kiküszöbölése.

A méhen belüli, madaraknál és hüllőknél a tojáson belüli embrionális fejlődés során a magzat nagyon érzékeny a környezeti hatásokra. Nemcsak a magzat genotípusa, a hatóanyag dózisa befolyásol(hat)ja az egyes hatóanyagok teratogenitálásának kialakulását, hanem a teratogén anyag szervezeten belüli metabolizmusa és a fejlődési stádium érzékenysége is (Wilson, 1973; Finnell, 1999). A gyógyszerek hatóanyagainak teratogenitást okozó hatása megelőzhető, ha ismert a teratogenitást kifejtő dózis, annak aktivitása és interakciója a szervezettel. Ezeknek az adatoknak a birtokában a gyógyszerek és egyéb kémiai anyagok a jelenben és a jövőben is nagyobb biztonsággal használhatók.

Az ökotoxikológia a kísérletek egységesítésén keresztül próbálja biztosítani a biztonságos gyógyszerek kutatását és a fajok milliói számára a megfelelő védelmet és életkörülményeket. Az ökotoxikológiai hatásokat kivétel nélkül minden anyagra ismerni kell, mert azok a táplálékláncon keresztül eljuthatnak a magasabbrendű állatokig, s végső sorban az emberig is a kultúrnövények és a vízhálózat közvetítésével (Kiss - Várnagy, 1997).

2.1.2. Ökotoxikológia, kísérleti- és tesztállatok

A környezetvédelmi törekvések az elmúlt 30-40 évben előtérbe helyezték a környezet élő világának védelmét, elsősorban a vegyi (gyógyszerek, háztartásban és az iparban használt vegyszerek, peszticidek) terheléssel szemben. Az élővilág egészségvédelmét a vegyi anyagok alkalmazásának visszaszorításával fokozhatjuk, ezáltal csökkentjük a toxikológiai, mérgezési veszélyt. Másrészt széles körben alkalmazzuk azokat a környezet-toxikológiai vizsgálatokat,

amelyek segítségével modellezhetők, megismerhetők a környezet élő szervezeteiben mutatkozó toxikus hatások. Ezen információk alapján kidolgozhatók azok a megelőzési, elhárítási szabályok, amelyek környezet-egészségügyi szempontból a hatékony megelőzést szolgálják. A háziállatokon ilyen jelleggel elvégzett tesztek a gyógyszernek szánt vegyületek törzskönyvezési eljárásában szükségesek, valamint a környezetbe kerülő veszélyes vegyi anyagok toxikus hatásait hívatottak feltárni (Kiss - Várnagy, 1997).

2.2. Az afrikai karmosbéka (*Xenopus laevis*) irodalma

2.2.1. A tudományban elfoglalt helye

Az afrikai karmosbékát az 1930-as évek elejétől számos tudományos kísérletben alkalmazták, mint ideális modellállatot (Cannatella - deSá 1993; Bantle - Rand 1995). Először humán vonalon, a terhesség megállapítására (Hogben-teszt) használták (Crew, 1939; Landgrebe, 1939), majd Nieuwkoop (1961) az egyedfejlődés egyes stádiumait tanulmányozta rajta. Az afrikai karmosbékát más jellegű kísérletekben is alkalmazzák az emlősmodell helyettesítésére. Ilyen a pajzsmirigy funkciójának vizsgálata különböző vegyületek hatására (U.S. Environmental Protection Agency, 1998). Manapság az embriológiai és gyógyszer-ártalmassági vizsgálatok nélkülözhetetlen és megbízható állatmodellje.

2.2.2. Előnyök és hátrányok

Az afrikai karmosbéka fejlődéséről, szaporításáról és metamorfózisáról bőséges irodalmi adat áll rendelkezésünkre. Tartása egyszerű, laboratóriumi körülmények között is kivitelezhető, ezért világszerte elterjedt modellállat. Szaporítása évszaktól független, genomja ismert. Egyszerre sok utódot hoz létre, ezért a kísérletekhez és mérésekhez megfelelő számú egyed áll rendelkezésünkre. További előnye, hogy az emlősökkel, a madarakkal és a hüllőkkel ellentétben az embriói a szabadban fejlődnek, így megfigyelhetőek.

Az afrikai karmosbéka, mint kísérleti állatmodell hátrányai közé sorolható a hosszú (12-24 hónap) szaporodási intervallum és a bár ismert, de oligotetraploid genom (Vršková, 2005).

2.2.3. Elterjedés és életér

Az afrikai karmosbéka (*Xenopus laevis*) a kétélűek (*Amphibia*) osztályába, ezen belül a békák (*Anura*) rendjébe és a pipabékafélék (*Pipidae*) családjába tartozó faj. Természetes élőhelye Dél- és Közép-Afrikában van (Gurdon - Hopwood, 2000). A tudományos kísérletekben való felhasználásuk miatt az egyedeit az 1930-as és az 1960-as években szállították Európába és Észak-

Amerikába. Jelenleg Chilében, Franciaországban, Indonéziában, Olaszországban (Szicília), Portugáliában, Nagy-Britanniában és az Amerikai Egyesült Államokban élnek populációi (Nieuwkoop - Faber, 1994). A faj kimondottan vízi élőlény, csupán a kényszerített migráció esetén hagyja el a vízi környezetet. A zöld algával borított, buja vegetációjú állóvizet kedveli leginkább (Garvey, 2000). Nagyon jól alkalmazkodik a környezetéhez, a pH széles spektrumát és a 15-26 °C-ig terjedő hőmérsékleti ingadozásokat jól tűri.

2.2.4. Külső megjelenés

Az afrikai karmosbéka tökéletesen alkalmazkodott a vízi életmódhoz. Teste dorsoventrálisan lapított, feje lapos, ék alakú. A hátsó végtagjai erősen izmoltak, az ujjak úszóhártyával vannak összekötve. Testét finom bőr fedi, mely apró zöldes-barna foltokkal pigmentált. Ez a faj a tudományos nevét a hátulsó végtagjainak első három ujján található hegyes, fekete karmokról kapta, melyek a táplálék szakításában játszanak szerepet.

Az ivari dimorfizmus nagyon kifejezett. A nőstény a hímnél nagyobb, általában 10-15 cm hosszú, és a kloaka nyílása körül rózsaszínű alakú képlet található (1. kép). A hím kisebb, 5-10 cm hosszúságot ér el, mellső végtagjainak ujjain belülről a bőr megvastagodott, sötét, amely a párzás időszakában megfeketedik (2. kép).

2.2.5. Laboratóriumi tartásmód

A felnőtt egyedeket a Brünni Állatorvos-tudományi és Gyógyszerészeti Egyetem Közegészségügyi és Toxikológiai Intézetének állatházában, párokban (egy hím és egy nőstény) vagy nemtől függetlenül csoportosan tartottuk (3-4 egyed). Elhelyezésük FETAX-oldattal feltöltött, 25 literes tartályokban történt, a víz hőmérséklete 23 ± 3 °C volt. Az előírás szerint 12 órás megvilágítást alkalmaztunk. Az állatok etetése hetente három alkalommal apróra vágott marhamájjal történt.

2.3. A szulfametoxazol irodalma

A szulfametoxazol a szulfonamidok csoportjába tartozó szintetikus, bakteriosztatikus vegyület. A szulfonamidok a legrégebb óta használt kemoterapeutikumok. Az első hatásos szulfonamidot a német Bayer cég mutatta be 1932-ben, Prontosil fantázianév alatt. A német cég sikerét Gerhard Domagk-nak, német bakteriológusnak köszönheti. A Prontosil volt az első szintetikus gyógyszer, amely a *Streptococcus* fajok okozta fertőzéseket, a gyermekágyi lázat



1. kép: Afrikai karmosbéka (*Xenopus laevis*), nőstény.



2. kép: Afrikai karmosbéka (*Xenopus laevis*), hím.

küzdött le, és az *Erysipelothrix rhusiopathiae* ellen is hatékony volt. Ugyanakkor a gyógyszer csak az élő szervezetben fejtette ki a hatásait, *in vitro* hatástalannak bizonyult. Azt, hogy a szulfonamidok az élő szervezetben metabolizálódnak, és az inaktív színes forma egy kisebb, színtelen, aktív formává, szulfanilamiddá alakul át, a Pasteur Intézet kutató csoportja fedezte fel és bizonyította. A penicillin feltalálása (1928) előtt és a második világháború évei alatt az elsősegélyládák egyik nélkülözhetetlen tartozéka volt a szulfonamidok aktív metabolitja, a szulfanilamid, tableta és por formájában. Mindennemű fertőzések gyors és sikeres kezelésére használták (Guthrie, 1958).

Manapság és az elmúlt ötven évben, széles körben alkalmazzák a szulfonamidok csoportját gazdasági haszonállatok és kedvtelésből tartott állataink kezelésére. A szulfonamidok olcsó és könnyen hozzáférhető kemoterapeutikumok. Széles spektrumú bakteriosztatikus vegyületek, a Gram-pozitív és a Gram-negatív aerob és anaerob baktériumok ellen egyaránt hatékonyak, a kokcídiumok és a *Toxoplasma* fajok okozta megbetegedések kezelésekor is alkalmazzák. Sikerüket a jól ismert hatásmechanizmusuknak köszönhetik; kompetitív módon gátolják a PABA kapcsolódását a dihidropteroát-szintetáz enzimhez. Így megakadályozzák a PABA beépülését a folsavba.

A szulfonamidokat a baktericid hatás, a csökkent rezisztencia és a szélesebb antibakteriális és antiprotozoás spektrum elérése érdekében 2,4-diaminopirimidinekkel kombinálják. Az együttes baktericid hatás úgy érhető el, hogy a 2,4-diaminopirimidinek a folsavszintézis egy másik lépését gátolják; a dihidro-folsav-reduktáz enzimhez kapcsolódva megakadályozzák a dihidrofolsav átalakulását tetrahidrofolsavvá (Adams et al., 1995).

A baktériumok elleni védekezés ily formája nagyon hatékony, mert a baktériumok önmaguk termelik a folsavat, míg az emlőssejtek a külvilágból veszik fel azt.

2.4. A ketoprofen irodalma

A ketoprofen a nem szteroid gyulladáscsökkentők, azon belül az arilpropionsav-származékok csoportjába tartozik. A ketoprofen nem szelektív COX-gátló, a ciklooxygenáz-1 (COX-1) és a ciklooxygenáz-2 (COX-2) izoenzimeket egyaránt gátolja, így gyulladáscsökkentő, fájdalom- és lázcsillapító hatással rendelkezik. A ciklooxygenáz enzim az arachidonsav metabolizmusáért felelős, amelyből prosztaglandinok, prosztaciklinek és thromboxánok keletkeznek. A hízósejtekből felszabaduló prosztaglandinok olyan lipidek, amelyek vasodilatációt okozhatnak, és felelősek a láz és fájdalom kialakulásáért. A láz kialakulásáért a prosztaglandin-E2 megnövekedett szintje felelős, amely a termoreguláció központját, a hipotalamuszt serkenti. A

ciklooxygenáz enzim gátlása miatt a prosztaglandin-E2 szintje és így a hipotalamuszra kifejtett serkentő hatása csökken (Boynton et al., 1988).

A ketoprofent a humán gyógyászatban a reumás arthritis kezelésére alkalmazzák, bizonyítottan hatékony, akár csak az acetil-szalicilsav, a naproxen, az indomethacin, az ibuprofen, a diklofenak és a piroxicam (Avouac - Teule 1988). Az állatgyógyászatban izmok és inak gyulladásának kezelésére alkalmazzák leggyakrabban, az ismertebb kezelt kórképek közé tartozik a *Varicella zoster* vírus okozta „post-herpetic” neuralgia (herpesz utáni idegbántalom), a *nervus ischiadicus* gyulladása és a fájdalommal járó ideggyulladások többsége. Megjegyzendő, hogy a ketoprofen kedvező hatásai mellett számos emésztőszervrendszeri problémákat okoz azoknál a pácienseknél, akik gyakran használják (Gabriel et al., 1991).

2.5. A teratogén hatóanyagok irodalma

Az általunk vizsgált szulfametoxazonon és ketoprofenen kívül még számos hatóanyag rendelkezik bizonyított teratogén hatással. Ezek közé tartoznak az állatorvoslásban is napi rutinnal használt kemoterapeutikumok, a kaptopril, enalapril, methotrexat, penicillamin és a tetraciklinek (Bracken - Holford, 1981). Ezek a hatóanyagok meghatározott körülmények között nem okoznak teratogén elváltozásokat, de a magas dózis, illetve a kezelt beteg érzékenysége, genetika hajlama a teratogén potenciállal bíró hatóanyagok kifejeződését segíti elő.

2.5.1. A szulfametoxazol toxicitásának irodalma

A szulfametoxazol halakra kifejtett mutagén és genotoxikus hatását számos kísérletben bizonyították. Figyelemre méltó az olasz kutatók körében végzett vizsgálatok sora. Isidori et al. (2005) hat antibiotikum (eritromicin, oxitetraciklin, szulfametoxazol, ofloxacin, linkomicin és klaritromicin) vízi környezetben kifejtett ökotoxikológiai hatását ellenőrizték baktériumokon, algákon, pörgekarúakon és halakon. A vizsgált anyagok egyike volt a szulfametoxazol (1–100 mg/l-es koncentrációkban) is, amelynek mutagén tulajdonságát igazolták. Eredményeik alapján arra következtettek, hogy a vizsgált antibiotikumok, tehát a szulfametoxazol is, káros hatással bírnak a vízi környezetben élő állatokra. A halakon, különösen a zebradánión (*Brachydanio rerio*) végzett toxicitási kísérletek nagyon megbízhatóak, ezt támasztja alá a 2011 szeptemberében publikált portugál kísérlet. Madureira et al. (2011) a Dour-folyóban felhalmozódó xenobiotikumok zebradánió-embriókra kifejtett hatását vizsgálták. Az embriókat a természetes környezetben is előforduló gyógyszerhatóanyagok keverékével kezelték, amely szulfametoxazolt is tartalmazott. Az eredmények alapján elmondható, hogy a keverék, így a szulfametoxazol is, gerincvelői deformitásokat, szikmirigy-ödémát és a farok növekedésbeli csökkenését ($3208 \pm 145 \mu\text{m}$ -ról

3130±126 µm-re) okozta. A használt keverék nem befolyásolta a mortalitást és a kelési arányt sem. Az eredményekből arra következtettek, hogy a keverék veszélyt jelent a vadon élő élőlényekre, állatokra. További kísérleteket is végeztek zebradánió-lárvákön, amelyekkel a szulfametoxazol pajzsmirigyműködésre kifejtett károsító folyamatát igazolták (Thienpont et al., 2011). Ezt a hatást már korábban is vizsgálták Sprague-Dawley patkányokon, és arra a megállapításra jutottak, hogy a szulfametoxazol a pajzsmirigy állományának növekedését, follikuláris hyperpláziáját okozta (Cohen et al., 1980). Ugyanezt a megállapítást alátámasztotta kísérletében Swarm et al. (1973) is. Nemcsak CD patkányokkal, hanem rhesus makákókkal (*Macaca mulatta*) is szulfametoxazol-tartalmú tápot etetett különböző koncentrációkban. A patkányokkal ellentétben, a majmoknál nem volt kimutatható a hatóanyag által okozott pajzsmirigy hyperplasia. Ugyanerre a megállapításra jutottak Takayama et al. 1986-ban.

A szulfametoxazol a felszíni vizekben ng/l nagyságrendben található, jelenlétét az ivóvizekben is kimutatták. A víz ózonnal történő fertőtlenítésével káros hatása csökkenthető. Az ózon az egyik legerősebb oxidáló- és fertőtlenítőszer, ami a vízben lévő mikroorganizmusoktól függően 600-3000-szer hatékonyabb, mint a klór. Az oxidálási folyamatok során keletkező termékek (alkoholok, nitrátok és főleg szulfanilamidok) élő sejtekre kifejtett hatását Yargeau et al. (2008) vizsgálták. Az eredményekből levonható, hogy az ózonnal történő fertőtlenítés során keletkező degradációs termékek nem jelentenek veszélyt az élő sejt számára.

Patkányokon végzett kísérletekben kimutatták, hogy a szulfametoxazol idioszinkráziás reakciót okozhat. A kialakuló hiperszenzitivitás azzal magyarázható, hogy a szervezetben a bioaktiváció és az azt követő oxidáció nitrozo-szulfametoxazol (SMX-NO) képződését eredményezi. A szervezet SMX-NO dependens IgG molekulákkal reagál a képződésére, ami túlérzékenységi reakció kialakulásához vezet (Gill et al., 1997).

A felsorolt és röviden vázolt kutatói munkákból kitűnik, hogy a szulfametoxazol toxikológiai hatását túlnyomó többségben halakon és emlősökön végezték. A madarakon végzett kísérletekből nem találtunk említésre méltó példát. A szakirodalom kevés eredménnyel és információval rendelkezik a kételtűeken végzett kísérletekről, így az általunk leírt megfigyelések, eredmények jó alapot jelentenek a tudományos értekezések számára.

2.5.2. A ketoprofen toxicitásának irodalma

A ketoprofen toxikus hatását leginkább madarakon végzett kísérletek igazolják. Awan et al. (2011) a véletlenszerűen csoportokba osztott csirkéknek ketoprotent adagoltak 5 mg/ttkg mennyiségben intramuscularisan. Publikált adataikból következik, hogy a ketoprofen nem káros a csirke vesére. Megfigyeléseiket már MacAllister et al. (1993) korábban leírták, miszerint ez a

vegyület nem okoz szövetkárosító hatást a vesében. Ezzel ellentétben Naidoo et al. (2010) szerint a ketoprofen a vese tubulushám-sejtjeinek károsodását idézi elő. További tanulmányok alapján a ketoprofen nem okoz gyomor- és veseproblémákat. Azonban Swinkels et al. (1994), Garcia (1998) és Alarcon et al. (2002) gyomorvérzés és/vagy gyomorperforáció kialakulásának lehetőségére hívták fel a figyelmet. A csirkék sántaságának a ketoprofen 2 mg/ttkg-os dózisban történő kezelése során viselkedési zavarok kialakulását figyelték meg (Hadipour et al., 2011).

A ketoprofen teratogenitását alátámasztó vagy cáfoló irodalmi adatokból kevés áll rendelkezésünkre. A munkában bemutatott kísérletet abból a megfontolásból végeztük el, hogy eredményeinkkel a szakirodalom ezen ágát is gazdagítsuk.

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. Felhasznált vegyületek

3.1.1. Szulfametoxazol

A kísérletben a kizárólag laboratóriumi célra gyártott Sulfamethoxazole S7507 (Fluka, Olaszország) vegyületet teszteltük. A szulfametoxazolt az alábbi koncentrációkban vizsgáltuk: 15, 50, 100, 150 és 250 mg/l. Oldószerünk a FETAX-oldat volt, amely ugyanakkor negatív kontrollként is szolgált.

3.1.2. Ketoprofen

A kísérletben a kizárólag laboratóriumi célra gyártott Ketoprofen K2135 (Sigma- Aldrich, Kína) terméket teszteltük. A ketoprofent az alábbi koncentrációkban alkalmaztuk: 1, 5, 10 és 15 mg/l. Oldószerünk a FETAX-oldat volt, amely ugyanakkor negatív kontrollként is szolgált.

3.2. A FETAX (Frog Embryo Teratogenesis Assay- Xenopus)-módszer

A kísérleti berendezések kialakítását, a kísérlet pontos menetét és módját az ASTM (American Society for Testing and Materials) E1439-98 számú standardizált protokolljában leírtak alapján végeztük. Az amerikai szabványosított eljárást kellett követnünk, ugyanis az európai OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) irányelvek között nem szerepel az afrikai karmosbéka felhasználása embrionális toxicitási vizsgálatokra.

A teszt módszertana az északi leopárdbéka (*Rana pipiens*) és az amerikai varangy (*Bufo americanus*) alkalmazását is javasolja az afrikai karmosbéka helyettesítésére. Számos kémiai vegyület FETAX-teszttel igazolt teratogenitási értékei az RATL (A Database of Reptile and Amphibian Toxicology Literature) adatbázisában könnyen elérhetők (Pauli et al., 2000). Az adatbázis még nem tartalmazza az általunk vizsgált ketoprofenre és szulfametoxazolra vonatkozó adatokat.

A kísérlet egyes pontjait, az eredményeket a munkanaplóba jegyeztük fel. Az általunk követett irányelv a vizsgált hatóanyagok békaembrió fejlődésére kifejtett toxicitásának jelenlétét igazolja, vagy cáfolja. A teszt komplex kémiai vegyületek, hatóanyagok, kereskedelmi készítmények tesztelésére szolgál; előnye, hogy emlősökre és más fajokra is extrapolálható eredményt ad viszonylag rövid időn belül. A teszt az utódokban jelentkező fejlődési rendellenességek indikálására használható, amely megmutatkozhat az embrió pusztulásában, gátolt

növekedésében, valamint a fenotípusban is. Alkalmazásával az ökototoxicitás pontos előrejelzése is lehetséges, hiszen a vizsgált anyagok már sokkal kisebb koncentrációban hatnak a békaembriókra, mint a felnőtt, kifejtett egyedekre, így egy igen érzékeny tesztrendszer hozható létre. Érzékenysége és gyorsasága miatt a FETAX-eljárást a teratogenitás szűrésére és kizárására lehet a legjobban használni, leginkább negatív eredmény esetén. Ha viszont a vizsgált anyag teratogenitást mutat, akkor más tesztekkel és tesztorganizmusokkal is bizonyítani kell (Gruiz et al., 2001). A TDK munkámban vizsgált két hatóanyag teratogén tulajdonságát más tesztekkel nem vizsgáltuk.

3.2.1. A szülőpárok kezelése és elhelyezése

A munkában ismertetett kísérletet a Brünni Állatorvos-tudományi és Gyógyszerészeti Egyetem Közegészségügyi és Toxikológiai Intézetének laboratóriumában végeztük. A kísérletsorozatainkban felhasznált békaembriókat humán choriogonadotropinnal (Pregnyl 1500, N. V. Organon, Hollandia) kezelt szülőpároktól nyertük. Az Intézet felnőtt egyedei Franciaországban regisztrált tenyészetből (Xenopus Expres®) származtak. A szulfametoxazol és a ketoprofen teszteléséhez két-két szülőpártól származó békaembriókat használtunk fel. A hímeket 150 NE humán choriogonadotropinnal, a nőstényeket, pedig 300 NE humán choriogonadotropinnal kezeltük a délutáni órákban, egy nappal a kísérlet kezdete előtt. A készítményt a békák dorsalis limfátikus zsákjába injektáltuk (3. kép). Az injektálást követően az állatokat 25 liter ürtartalmú, FETAX-oldattal feltöltött műanyag tartályokba helyeztük. A víz hőmérséklete a protokollban leírtak alapján 23 ± 3 °C volt. A tenyésztőedény aljára egy fémrácsot helyeztünk, amely megakadályozta a szülőket, hogy a lerakott petéket letapossák, elfogyasszák. A hormonális kezelést követően a békák coitusára, az ún. amplexusra, 2-6 órán belül került sor (4. kép), a peterakás, pedig 12 órán belül kezdődött. Az egymást követő hormonális stimulációk között eltelt időnek, az ún. nyugalmi periódusnak, 1-2 hónapnak kell lennie. Az ismételt teszt kivitelezésének megnövekedett hosszát, illetve körülményességét a nyugalmi periódus betartásával magyarázzuk. A nőstények 2-3, a hímek 3-5 évig fertilisek, amennyiben a tenyésztési körülmények megfelelőek, a stimuláció és a nyugalmi periódus közötti idő hossza betartott (OECD 46, 2004).

A FETAX-oldat az alábbiakat tartalmazta az ASTM E1439-98 protokolljában leírtaknak megfelelően: 625 mg NaCl, 96 mg NaHCO₃, 30 mg KCl, 15 mg CaCl₂, 60 mg CaSO₄·2H₂O, 75 mg MgSO₄, 1000 ml desztillált víz.



3. kép: Humán *choriogonadotropin* injektálása a *dorsalis* limfatikus zsákba.



4. kép: A hormonális kezelést követő *amplexus*.

3.2.2. A peték csoportosítása és kezelése

A peterakást követő napon a petéket műanyag Pasteur-pipettával vettük ki az edényből, és a minőségüket binokuláris mikroszkóp segítségével bíráltuk el (5. kép). A fejlődés egyes fázisait a Normal table of *Xenopus laevis* (Daudin) (Nieuwkoop - Faber, 1994) táblázat alapján határoztuk meg. A kiválasztott embriókat a középső blasztula (8. szakasz), illetve a korai gasztrula (11. szakasz) fázisokban ültettük be a kísérletünkbe (6. kép). A csoportokat 25 embrióból alakítottuk ki, melyeket 10 ml FETAX-oldatot tartalmazó Petri-csészékben 24 ± 2 °C hőmérsékleten, 12 órás fotoperiódus idő mellett termosztátban tároltuk a kísérlet teljes hossza alatt.

Minden koncentrációnak megfelelően két csészénk volt. Szulfametoxazol esetében kétszer végeztük el a kísérletet, a ketoprofen tesztelését csak egyszer tudtuk kivitelezni, ugyanis a szülőpárok nem raktak megfelelő minőségű és mennyiségű petét.

A hatóanyagokat a 3.1.1 és 3.1.2 fejezetben megadott koncentrációkban ismételten, 24 óránként adagoltuk az embriókat és a FETAX-oldatot tartalmazó csészékbe. A tenyészeteket 24 óránként megvizsgáltuk és eltávolítottuk, ill. feljegyeztük az elpusztult embriókat, illetve lárvákat.

3.2.3. Kiértékelés

A lárvákat 96 óra után széndioxid-tartalmú vízben extermináltuk, majd 3%-os formalinban tároltuk. A hatóanyagok okozta fejlődési rendellenességeket és a lárvák testhosszát számítógéphez csatlakoztatott Olympus SZX9 sztereomikroszkóppal mértük és értékeltük. A rendellenességek típusait és az elváltozásokat az Atlas of Abnormalities: A Guide for Performance of FETAX (Bantle et al., 1998) képes album alapján határoztuk meg.

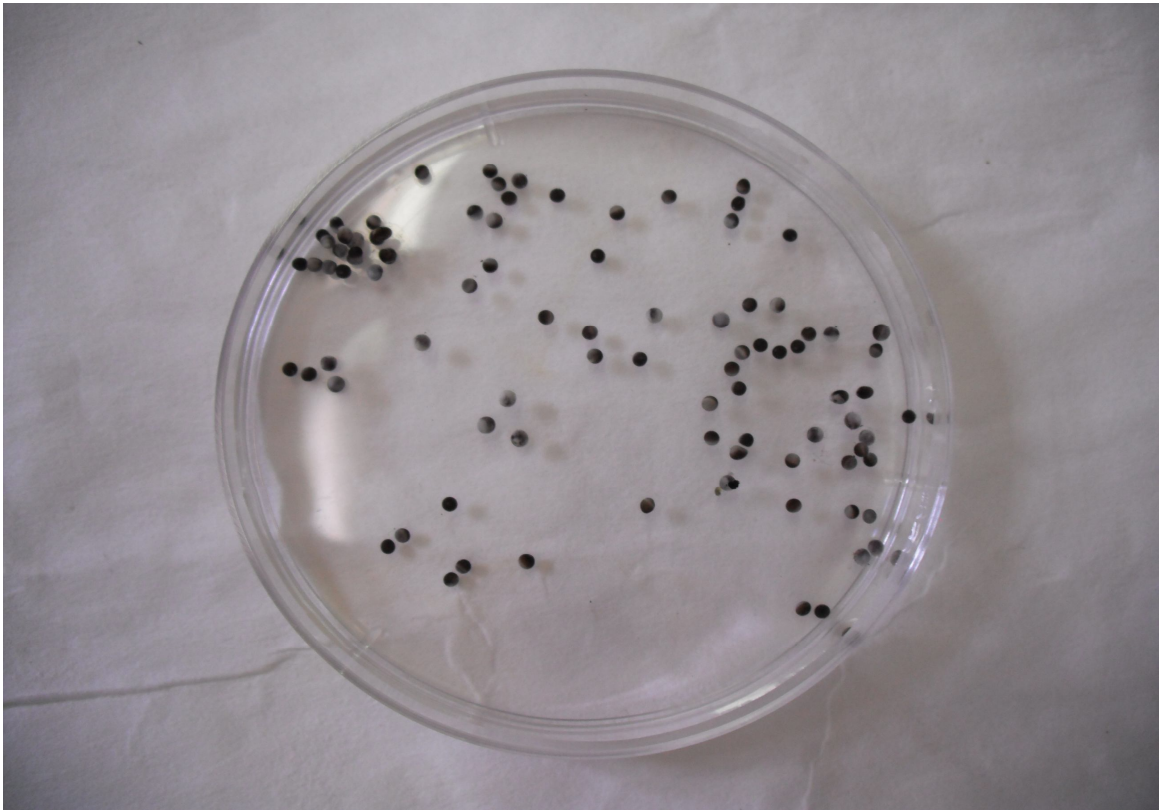
Az eredményeinkből kiszámítható adatok:

- 96-h LC₁₀, LC₅₀ (letális koncentráció (Lethal Concentration), mely a tesztorganizmus 10 vagy 50%-ának pusztulását okozza a 96 órás tesztben)
- 96-h EC₁₀, EC₅₀ (hatásos koncentráció (Effect Concentration), mely a mérési vagy vizsgálati végpont 10 vagy 50%-os csökkenését okozza a 96 órás tesztben)
- MCIG (Minimal Concentration Inhibiting Growth – a legalacsonyabb koncentráció, mely a lárvák növekedési gátlását okozza)
- TI (teratogenitási index, 96-h LC₅₀/96-h EC₅₀ hányadosa).

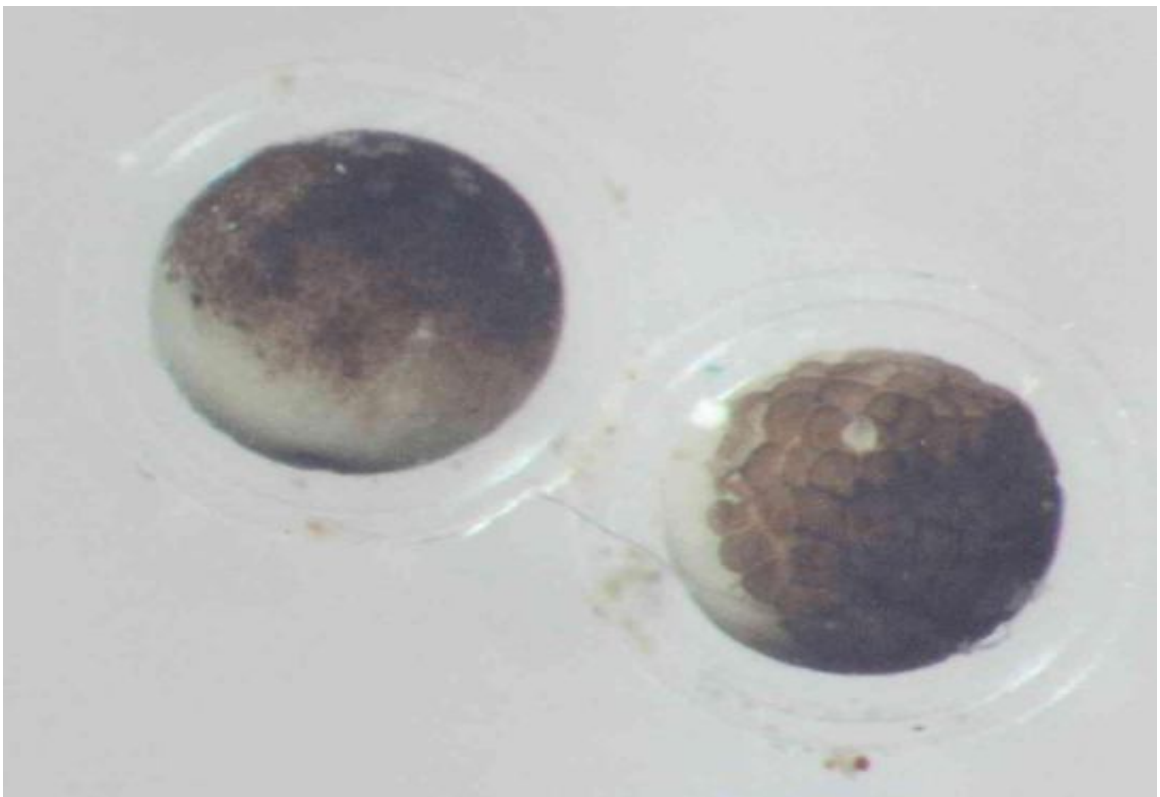
3.2.4. Az adatok statisztikai elemzése

A munkában közölt 96 órára vetített EC_{50} és LC_{50} , a szulfametoxazol esetében a 96 órára vetített EC_{10} és LC_{10} értékeket az US EPA LC_{50} (<http://www.epa.gov/nerleerd/stat2.htm#probit>) probit analízis program 1.5 verziója segítségével számoltuk ki.

A testhossz koncentrációtól való függésének kimutatására egytényezős ANOVA-t, az egyes koncentrációknak a kontrollhoz való hasonlítására Dunnett-próbát használtunk. Az elemzést az R2.12.2 programmal végeztük.



5. kép: A peték minőségi vizsgálata.



6. kép: A peték középső blasztula (8. szakasz) és korai gasztrula (11. szakasz) fázisokban (Vršková, 2005).

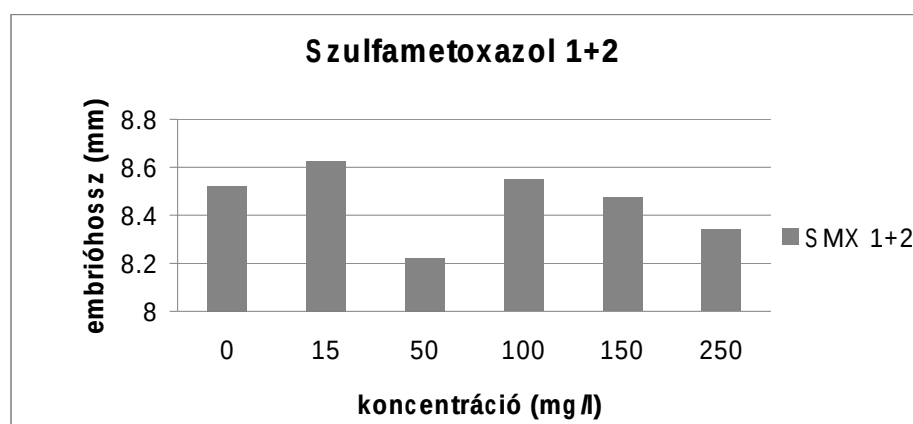
4. EREDMÉNYEK

A szulfametoxazol és a ketoprofen növekedési gátlását és teratogén elváltozásokat okozó hatását vizsgáló kísérletet a 3.1.1 és 3.1.2 fejezetekben megadott koncentrációkban, két sorozatban (25-25, összesen 50 embrión) végeztük el. A szulfametoxazollal végzett kísérletet megismételtük, így a két ismétlést összevetve, minden meghatározott koncentrációban 100 embrió állt rendelkezésünkre.

Az 1. táblázat és ábra a szulfametoxazol békálárvákra kifejtett növekedési gátlását szemlélteti. A szulfametoxazollal végzett első kísérlet eredményei igazolják, hogy a szer növekedési gátlást okozott, ugyanis a békálárvák hossza a növekvő koncentrációval csökkent. A hossz koncentrációtól való függése az ANOVA szerint is szignifikánsan csökkent ($p < 0,05$). A szulfametoxazollal végzett második kísérlet, sajnos, nem támasztja alá az imént leírtakat. A szer nem vezetett jelentős növekedési csökkenéshez, valamint az ANOVA szerinti csökkenés sem volt szignifikáns ($p > 0,05$). A két kísérlet együttes elemzése során ugyancsak érzékelhető, hogy a szulfametoxazol alig megfigyelhető növekedési csökkenést okozott a békaembriókban. Az ANOVA szerint a hossz koncentrációtól való függése szignifikánsan nem csökkent ($p > 0,05$).

1. táblázat: A békálárvák koncentrációtól függő növekedési csökkenése a szulfametoxazol kezeléseket követően.

Vegyület	Koncentráció (mg/l)	Embriók száma (n)	Lárvák átlagos hossza (mm $\pm$ SD)
Szulfametoxazol 1	0	44	8,99 $\pm$ 0,54
	15	46	8,90 $\pm$ 0,71
	50	0	-
	100	47	8,90 $\pm$ 0,75
	150	46	8,79 $\pm$ 0,94
	250	44	8,49 $\pm$ 0,57
Szulfametoxazol 2	0	50	8.12 $\pm$ 1.05
	15	49	8.37 $\pm$ 0.60
	50	49	8.22 $\pm$ 0.99
	100	48	8.21 $\pm$ 0.75
	150	47	8.17 $\pm$ 0.93
	250	44	8.20 $\pm$ 1.11
Szulfametoxazol 1+2	0	94	8,52 $\pm$ 0,95
	15	95	8,63 $\pm$ 0,71
	50	49	8,22 $\pm$ 0,99
	100	95	8,55 $\pm$ 0,82
	150	93	8,48 $\pm$ 0,98
	250	88	8,34 $\pm$ 0,89



1. ábra: A szulfametoxazol hatása az embriók hosszára.

Azt, hogy az első kísérletben a szulfametoxazol növekedési gátlást okozott és, hogy a legnagyobb, 250 mg/l-es koncentrációjával kezelt békaembriók hossza a kontroll csoporthoz képest jelentős változást mutatott, igazolják a Dunnett-próbából kapott eredmények is. Ezeket az értékeket a 2. táblázatban foglaltuk össze.

2. táblázat: A szulfametoxazollal végzett kísérletek eredményeinek statisztikai elemzése (Dunnett-próba).

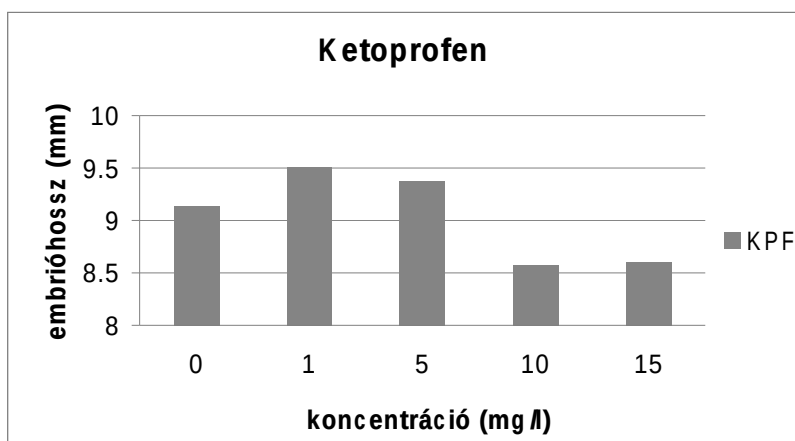
Vegyület	Koncentráció (mg/l)	Csökkenés	SE	t-érték	p-érték
Szulfametoxazol 1	15	-0,08202	0,15167	-0,541	0,95293
	50	-	-	-	-
	100	-0,08849	0,15088	-0,586	0,93811
	150	-0,19506	0,15167	-1,286	0,50523
	250	-0,50000	0,15335	-3,261	0,00483
Szulfametoxazol 2	15	0,24935	0,18465	1,350	0,529
	50	0,10241	0,18465	0,555	0,975
	100	0,09242	0,18562	0,498	0,984
	150	0,05009	0,18663	0,268	0,999
	250	0,07745	0,18988	0,408	0,993

A ketoprofennel végzett kísérletet nem tudtuk ismételten véghezvinni, ugyanis a szülőpárok nem raktak megfelelő minőségű és mennyiségű petét.

Az embriók hossza a ketoprofen 1 és 5 mg/l koncentrációjú kezelése során még nem csökkent, azonban a 10 és 15 mg/l-es koncentrációknál már jelentősen. A 3. táblázatban összefoglalt adatokból látszik, hogy a békaembriók átlagos hossza szignifikánsan függ a koncentrációtól ($p < 0,0001$). Az embriók koncentrációtól függő alakulását a 2. ábra mutatja be.

3. táblázat: A békalárva koncentrációtól függő növekedési csökkenése a ketoprofen kezelést követően.

Vegyület	Koncentráció (mg/l)	Embriók száma (n)	Lárva átlagos hossza (mm ± SD)
Ketoprofen	0	49	9,14±1,16
	1	50	9,51±0,40
	5	49	9,37±0,82
	10	49	8,58±1,08
	15	5	8,60±0,37



2. ábra: A ketoprofen hatása az embriók hosszára.

A 4. táblázatban látható értékek alapján megállapítható, hogy a ketoprofen 10 mg/l-es koncentrációja szignifikáns ($p < 0,05$) növekedési csökkenést okozott. A 15 mg/l-es koncentráció a kis elemszám miatt nem szignifikáns.

4. táblázat: A ketoprofennel végzett kísérlet eredményeinek statisztikai elemzése (Dunnett-próba).

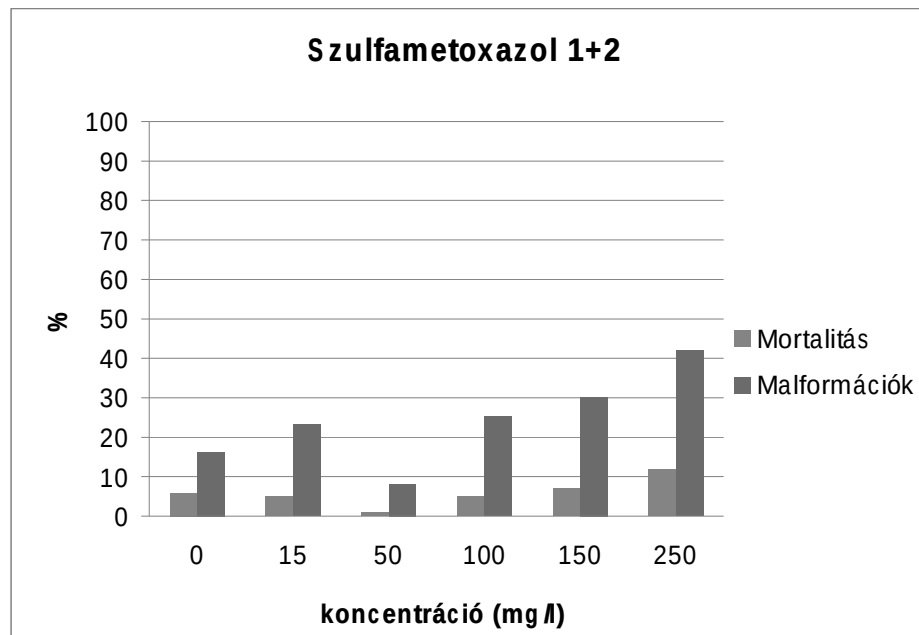
Vegyület	Koncentráció (mg/l)	Csökkenés	SE	t-érték	p-érték
Ketoprofen	1	0,3712	0,1820	2,039	0,14384
	5	0,2306	0,1829	1,261	0,55582
	10	-0,5592	0,1829	-3,056	0,00964
	15	-0,5388	0,4251	-1,267	0,55101

A teratogén vegyületek hatására az utódokban jelentkező fejlődési rendellenességek az embriók pusztulásában is mutatkozhatnak. A teszt protokollja szerint a kontrollcsoportban előforduló elhullás 5%-ig tolerált. A kontroll csoportban ennél jóval magasabb, 12%-os elhullást figyeltünk meg. Az 5. táblázatban összefoglalt további adatok az embriók növekvő mortalitását szemléltetik a szulfametoxazol és a ketoprofen növekvő koncentrációjú kezeléseit követően.

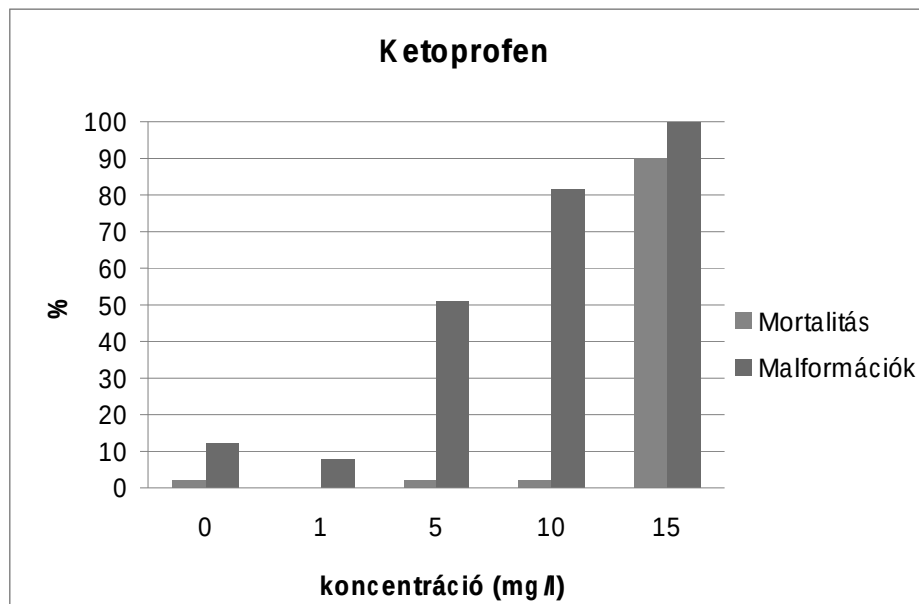
5. táblázat: A szulfametoxazol és a ketoprofen okozta elhullások és a rendellenes fejlődési formák előfordulása.

Vegyület	Koncentráció (mg/l)	Mortalitás (%)			Malformációk (%)		
		SMX 1	SMX 2	SMX 1+2	SMX 1	SMX 2	SMX 1+2
Szulfametoxazol							
	0	12	0	6	22,72	10	16,36
	15	8	2	5	28,26	18,36	23,31
	50	-	2	1	-	16,32	8,16
	100	6	4	5	25,53	25	25,26
	150	8	6	7	45,65	14,89	30,27
	250	12	12	12	63,63	20,45	42,04
Ketoprofen	0	2			12,24		
	1	0			8		
	5	2			51,02		
	10	2			81,63		
	15	90			100		

A szulfametoxazol és a ketoprofen okozta malformációk mértéke az 5. táblázatban és a 3-4. ábrán látható, a malformációk lokalizációja, pedig a 6. táblázatban figyelhető meg. A szulfametoxazol leginkább axiális deformációk és ödémák kialakulásához vezetett. Legnagyobb mértékben a 150 és 250 mg/l-es koncentrációja okozott gerinc deformitásokat az egyedek 17,39 és 32,95%-ában, valamint 100 mg/l-es koncentrációja ödémaképződést indukált az embriók 12,54%-ában. Elenyésző számban figyeltük meg az arcorri tájék deformációit, szemfejlődési rendellenességeket, illetve pigment- és bélfejlődési rendellenességeket. Kuriózumként értékeltük egy kétfejű embrió megjelenését a 250 mg/l-es szulfametoxazol kezelést követően. A ketoprofen 10 mg/l-es koncentrációja 77,55%-ban, 15 mg/l-es koncentrációja, pedig 100%-ban ödémaképződéshez vezetett. Az egyes elváltozások a 7- 10. képeken láthatók.



3. ábra: A szulfametoxazol hatása az elhullásra és a fejlődési rendellenességek alakulására.



4. ábra: A ketoprofen hatása az elhullásra és a fejlődési rendellenességek alakulására.

6. táblázat: A megfigyelt rendellenességek szervrendszerenkénti megoszlása.

Vegyület, koncentráció	Axiális deformáció	Ödémaképződés	Többszörös rendellenességek	F	E	P/G/D
Szulfametoxazol						
0	11,09	3,14	2,14	-	-	-
15	7,54	12,58	2,18		1,09	P 1,02
50	2,04	4,08	1,02	1,02	-	-
100	7,45	12,54	4,21	2,13	-	-
150	17,39	8,58	3,24	-	-	G 1,07
250	32,95	5,68	2,27	-	-	P 1,14 D 1,14
Ketoprofen						
0	2,04	4,08	6,12	-	-	-
1	2,00	2,00	-	-	-	G 4,00
5	12,24	28,57	4,08	-	-	P 2,04 G 2,04
10	4,08	77,55	-	-	-	-
15	-	100,00	-	-	-	-

F- arcorri tájék deformációi, E- szemfejlődési rendellenességek, **P/G/D**- pigmentképzési-, bélfejlődési rendellenességek, kétfejűség

A szulfametoxazolnál az embriók 50%-ának pusztulását okozó letális koncentrációt (LC_{50}) és az embriók hosszának 50%-os csökkenését okozó hatásos koncentrációt (EC_{50}) nem volt célszerű értékelni a kisszámú mortalitás és a nem jelentős növekedési gátlás miatt. Ezért a 96-h LC_{10} =200 mg/l és 96-h EC_{10} =132,85 mg/l értékeket adtuk meg. A ketoprofen szignifikáns növekedési csökkenést és elhullást okozott a békaembriókban, 96-h LC_{50} =12,1 mg/l és 96-h EC_{50} =5,67 mg/l értékekből a tertogenitási index (TI) és az embriók növekedési gátlását okozó legalacsonyabb koncentráció (MCIG) is meghatározható, melyeket a 7. táblázatban tüntettük fel.

7. táblázat: Teratogenitási paraméterek.

Vegyület	96-h LC_{10}	96-h EC_{10}	TI	MCIG
Szulfametoxazol 1+2	200 mg/l	132,85 mg/l	1,51 (módosított)	-
	96-h LC_{50}	96-h EC_{50}	TI	MCIG
Ketoprofen	12,1 mg/l	5,67 mg/l	2,13	10



7. kép: Axiális deformáció, szemtájéki, pharyngealis, testűri ödémaképződés (KPF 10 mg/l).



8. kép: Arcorri tájék deformációja a kontrollhoz (fent) viszonyítva (SMX 50 mg/l).



9. kép: Kétfejű embrió (SMX 250 mg/l).



10. kép: Axiális deformáció, pharyngealis és testűri ödémaképződés, pigmentképzési zavar (fent) (SMX 250 mg/l).

5. MEGBESZÉLÉS

A munkában ismertetett kísérletsorozat célja a szulfametoxazol és a ketoprofen biológiai szervezetre kifejtett teratogén hatásának megállapítása volt. A leírt eredmények nagy jelentőséggel bírnak, ugyanis a humán és az állatorvoslásban használt szerek nemcsak közvetlen módon (a beteg egyed kezelésével), hanem közvetett módon (a környezetbe került és felhalmozódott gyógyszerdegradációs termékek által) is negatív hatással lehetnek az emberre és az állatra egyaránt.

Az állatgyógyászatban használt antibiotikumok, főleg a haszonállatok körében alkalmazott szerek, metabolitjaik, illetve degradációs termékeik a trágyázás során, vagy a legeltetett állatok bélsarával, vizeletével a talajba és a vizekbe kerülhetnek, felhalmozódhatnak. Napjainkban a kutatás egyik fő területe a haszonállatok és produktumaik (bélsár, vizelet) általi környezetszennyezés (Kemper et al., 2008).

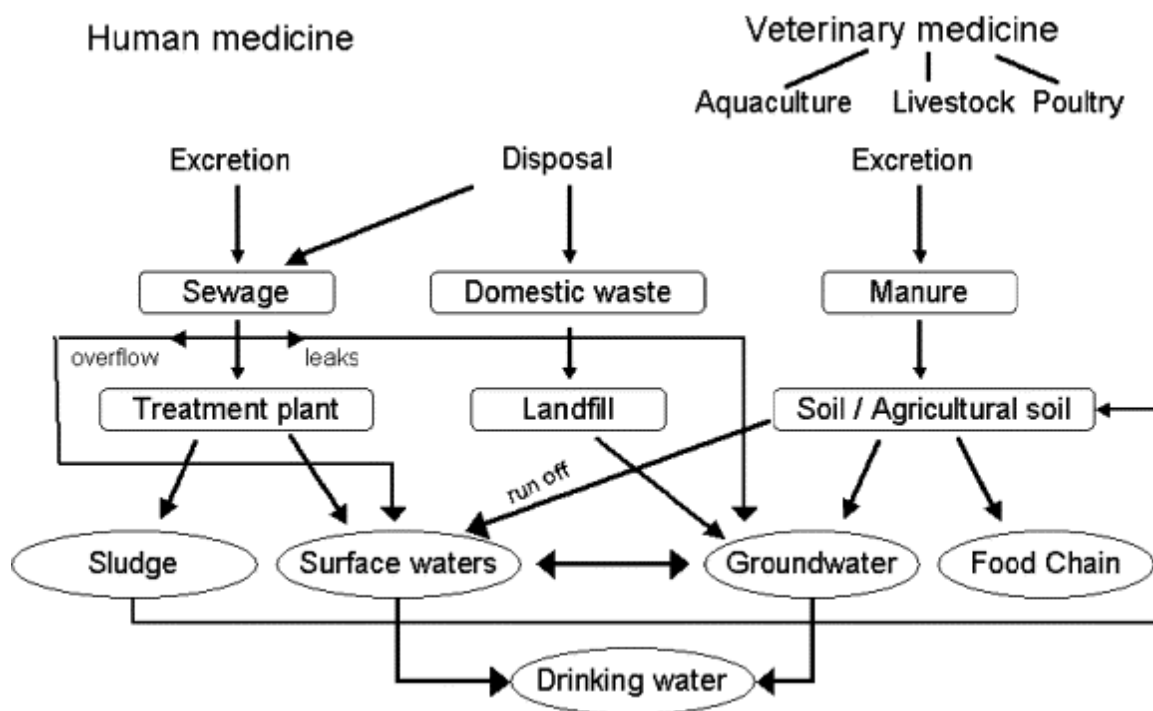
Az antibiotikumokkal kezelt gazdasági haszonállatok bélsarával és vizeletével történő trágyázás, a legeltetett állatok ürüléke a szivárgás és az esővíz általi bemosás útján kerül a talajba, majd a talaj mélyebb rétegeibe. A talajba jutott antibiotikumok, metabolitjaik, illetve degradációs termékeik a környező vizek szennyezéséért is felelősek (Alder et al., 2001). Az antibiotikumok egy része vízdoldékony, így a beadott gyógyszer 90%-a vizelettel, 75%-a, pedig a bélsárral ürülhet az állati szervezetből (Halling-Sørensen, 2001). A szulfonamidok, tetraciklinek és fluorokinolonok a leggyakrabban használt antimikrobiális szerek az állatgyógyászatban. A híg trágyában 91 mg/kg mennyiségben halmozódnak fel a szulfonamidok (Martinez-Carballo et al., 2007).

Kemper et al. (2008) által végzett kísérletek bizonyítják, hogy a szulfametoxazol a vizekben tartósan felhalmozódik. Eleven iszapos szennyvíztisztítóknál nem biodegradálható (Bialk et al. 2005). A talajvízben 410 ng/l koncentrációban (Sacher et al., 2001), a felszíni vizekben 480 ng/l koncentrációban (Hirsch et al., 1999), az ivóvízben, pedig 66 ng/l mennyiségben (Mückter, 2006) mutatható ki. Ugyanakkor a talajban is megtalálható, ahol a biológiai úton történő lebomlása nem igazolt. Az Eötvös Loránd Tudományegyetem Kémiai Intézet által mért adatok szerint a vegyület 17 ng/l koncentrációban halmozódik fel a környezetben (<http://enfo.agt.bme.hu/drupal/node/2915>). Ennek ellenére kis veszélyt jelent az emberek és állatok egészségére (Hunter et al. 2003).

A ketoprofen a Duna budapesti szakaszából vett mintában 1-5 ng/l koncentrációban volt jelen (<http://enfo.agt.bme.hu/drupal/node/2914>). Jelenlétét a Budapesten tisztított szennyvizekben 1000-1400 ng/l koncentrációban is kimutatták. A szennyvíztisztítóknál e vegyület 50%-ban degradálódik (Suzuki et al., 2006). Az ugyancsak arilpropionsav-származékok csoportjába tartozó ibuprofen kimutatását a vizekből már korábban leírták. A felszíni vizek közül a svájci folyókban és

tavakban, illetve az Északi-tengerből származó mintákban az ibuprofen 8 ng/l koncentrációig volt jelen (Buser et al., 1999).

Az 5. ábra a humán és az állatorvoslásban alkalmazott gyógyszerek metabolitjainak szervezeten kívüli útját szemlélteti (Díaz-Cruz et al., 2003).



5. ábra: A gyógyszerek metabolitjainak útja a szervezeten kívül (Díaz-Cruz et al., 2003).

Munkánkban a szulfametoxazol és a ketoprofen élő szervezetre kifejtett közvetlen hatásait vizsgáltuk. A két hatóanyag teratogenitását és növekedési gátlását igazoló irodalomból kevés állt rendelkezésünkre. A feltételezett növekedési gátlás csak a ketoprofen 10 mg/l-es koncentrációja esetén volt statisztikailag kimutatható. A 15 mg/l-es koncentráció is növekedés gátlást mutatott, de a 90%-os mortalitásból adódó kis elemszám miatt az eredményt el kellett vetnünk. A ketoprofen ismételt tesztelése nem valósulhatott meg, mivel a békák rossz minőségű, kevés petét raktak többszörös próbálkozás után. A ketoprofen első kísérletből adódó tulajdonságainak igazolása szintén további vizsgálatokkal volna lehetséges. A nem szteroid gyulladáscsökkentők családjába tartozó diklofenak fejlődési rendellenességet okozó káros hatását a zebradánió lárváin vizsgálták 0-2 mg/l koncentrációban. A 96 órás teszt eredményei alapján a felszíni vizekben felhalmozódó diklofenak 0-2 mg/l koncentrációban nem okozott fejlődési rendellenességeket, és a kontroll csoporthoz viszonyítva nem figyeltek meg jelentős halálozási rátát sem (Hallare et al., 2004). A szivárványos pisztránggal (*Oncorhynchus mykiss*) végzett kísérletek kimutatták, hogy a diklofenak

0,001 mg/l koncentrációban a máj, a vesék, és a kopoltyúk sejtjeinek strukturális károsodását okozta (Triebkorn et al., 2004).

A szulfametoxazollal végzett kísérletek eredményei ígéretes tendenciát mutattak a növekedés gátlásában. Ugyanakkor az első kísérlet során az 50 mg/l-es koncentrációban az összes békaembrió elpusztult. A tévesen pozitív 100%-os mortalitás oka a gyenge, fejletlen embriók kiválasztása lehet. A kísérlet technikai háttere, a felhasznált hatóanyag és a tápoldat minősége, illetve a iatrogén beavatkozás, manipuláció nem lehetnek az elhullás okai, hiszen a többi koncentráció esetében nem érzékelhető a tévesen pozitív eredmény. Megfigyeléseinket Koss et al. (2001) tapasztalatai is megerősítik, miszerint az afrikai karmosbéka tenyésztése során káros-kóros okokra nem visszavezethetően, az embriók fejlődési visszaesését és nagy mortalitását írták le. A kísérlet ismételése alátámasztja a leírtakat, hiszen a második sorozatban a szulfametoxazol 50 mg/l-es koncentrációjával kezelt békaembrióknál csak 1%-os volt a mortalitás. A vegyület tulajdonságainak pontos meghatározása érdekében ugyanakkor további vizsgálatok szükségesek.

Kísérletsorozatunk jelentős eredménye, hogy a szulfametoxazol és a ketoprofen okozta fejlődési rendellenességek százalékos gyakoriságát figyeltük meg és írtuk le. Az eredményekből kitűnik, hogy a szulfametoxazol és a ketoprofen leggyakrabban axiális deformációt és ödémaképződést okozott. A szulfametoxazol 250 mg/l-es koncentrációjával történő kezelés során egy kétfejű lárva megjelenését is leírtuk. A saját kísérletünk során nyert tapasztalataink megegyeznek a több irodalmi hivatkozással, miszerint a kísérleti elrendezésben használt teszttálatokon kialakuló deformitások patogenezisét sokféle tényező befolyásolhatja. Így, pl. a felhasznált víz minősége, a benne oldott egyéb anyagok, de akár a megvilágítás (fényprogram), az oldott gáztartalom, a szűrés mellőzése, a magas feszültségű vezetékek térereje stb. szintén szerepet játszhatnak esetleges deformációk kialakulásában.

A nehézségek ellenére a szulfametoxazol esetében a 96 órára vetített LC_{10} (200 mg/l) és EC_{10} (132,85 mg/l) értékeket meg lehetett határozni. A vegyület EC_{50} értékét eddig csak a *Synechoccus leopolensis* algán (EC_{50} = 0,03 mg/l/96h) és a *Ceriodaphnia dubia* vízi bolhán (EC_{50} = 15,51 mg/l/48h) határozták meg (Cunningham et al. 2006). A saját EC_{50} és LC_{50} értékek hiányában nem tudtuk meghatározni a legalacsonyabb koncentrációt, amely a lárvák növekedési gátlását okozza (MCIG). Korábbi adatok a *Pseudokirchneriella subcapitata* algára vonatkoznak, ahol az MCIG érték 7,5 μ mol/72h (Yang et al., 2008). Összehasonlítva a *Vibrio fischeri* baktériumokon végzett akut ökotoxikológiai tesztekben kapott eredmények (EC_{50} = 15,6 és 19,3 mg/l) alapján elmondható, hogy a szer a baktériumra enyhén toxikus (Carlsson et al., 2006). A ketoprofen 96-h LC_{50} értéke 12,1 mg/l volt. Elmondható, hogy a vegyület nem jelent veszélyt a kutya számára. Az irodalomban feltüntetett LC_{50} érték ugyanis 2000 mg/kg volt a kutya esetében

(Susan et al., 2003). Nem szabad figyelmen kívül hagyni, hogy az akut toxicitás mérésekor (EC_{10} , LC_{10} , EC_{50} és LC_{50} értékek meghatározása) a teszt rövidsége miatt a vizsgált hatás a teszt lejárta után jelentkezhethet, mint késői toxikus hatás. Ennek kiküszöbölésére krónikus vizsgálatokat célszerű végezni, melyek az utódokra gyakorolt hatást is kimutatják (Gruiz et al., 2001).

A békamodell alkalmazása a teratológiai és ökotoxikológiai vizsgálatokban viszonylag új keletű. Éppen ezért fontos kihangsúlyozni, hogy eredményeinket nem tudtuk összehasonlítani korábbi adatokkal, mivel azok nem álltak rendelkezésükre. Eredményeink helyességét, megbízhatóságát még további kísérletekkel szándékozunk igazolni. Reméljük, hogy a munkában bemutatott módszer és adataink jó alapot szolgálnak a teratológiai és ökotoxikológiai vizsgálatok kibővítéséhez.

5.1. A 96 órás FETAX teszt hátrányai, hibái

A FETAX-tesztet az emlősmodellek mellett, mint alternatív kísérleti elrendezést szerkesztették meg a teratogén és fejlődésbeli rendellenességet okozó vegyületek tesztelésére. Az afrikai karmosbeka (*Xenopus laevis*) kitűnő tesztállat, ugyanis tenyésztése és tartása laboratóriumi körülmények között nagyon könnyen megvalósítható. Fejlődésmenete pontosan ismert. Az ASTM által összeállított protokollban megfogalmazott kísérleti berendezések, körülmények kialakítása egyértelmű, minden laboratóriumban megvalósítható. Ennek ellenére a teszt kivitelezése közben több hiányosságot és nehézséget figyelt meg Hoke and Ankley (2005), amit kritikus összefoglalásukban szemléltettek. A tesztben előírt víz és táplálék minősége más és más az egyes laboratóriumokban. A megfigyelt és az általunk leírt fejlődési rendellenességek hátterében nemcsak a vizsgált hatóanyag teratogén hatása állhat, hanem sok esetben a FETAX-oldatban felhasznált víz minőségi paraméterei okozhatják az arcorri tájék és a bél malformációját. Ez leggyakrabban a lágy vizek magas kálium-tartalmával magyarázható (Tietge et al., 2000). A FETAX-oldatban előírt 620 mmol/l Mg^{2+} -koncentráció a kontroll csoportban is 5,4%-os malformációt okozott. Ugyanakkor más szerzők szerint (Luo et al., 1993) a Mg^{2+} -koncentráció csökkentése (62, 6,2 és 0 mmol/l-re) a kontroll csoportban a fejlődési rendellenességek növekedését (32, 100 és 100%) idézte elő. Egyértelművé válik, hogy a FETAX-oldat összetétele módosításra szorul, biztosítva a fals pozitív eredmények csökkentését. A módszer további hiányossága, hogy a követelmények között nem szerepelnek a FETAX-tápot alkotó víz minőségi paraméterei, a víz keménységi foka, az oldott oxigén mennyisége és az ammónia koncentrációja. A kísérlet során felhasznált víz kémiai összetételét legalább naponta egyszer ellenőrizni kéne, ami idő- és pénzigényes beavatkozás.

Említésre méltó, hogy a tartási körülményeknél előírt hőmérséklet ingadozása a malformációk számának növekedését eredményezheti.

Az afrikai karmosbéka oligotetraploid genommal rendelkezik, ennek hátránya a genetikai jellemzők szélesebb divergenciája szemben a diploid fajokkal. Ugyanakkor a békamodell nem helyettesítheti teljes mértékben az emlősmodelleket, mert a teratogenitást és fejlődési rendellenességeket okozó vegyületek a békák szervezetében egy meghatározott fokig metabolizálódnak, nem alakulnak át végleges aktív metabolitokká.

A FETAX-teszt érzékenyebb a 96-h EC_{50} meghatározására, összehasonlítva a 96-h LC_{50} érzékenységgel. Ez várható, ugyanis megfigyeléseink szerint kevesebb a nem letális malformációk megjelenése az élő szervezetben, mint a tesztelt organizmusok 50%-ának pusztulása.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A Brünni Állatorvos-tudományi és Gyógyszerészeti Egyetem Közegészségügyi és Toxikológiai Intézetének laborprofiljában szereplő öko- és klinikotoxikológiai kísérleteinek része volt a dolgozatban tárgyalt kísérletsorozat.

A vizsgálatunkban alkalmazott ketoprofen és szulfametoxazol toxikus, mutagén és teratogén hatását már korábban is vizsgálták különböző állatfajokon (halakon, békákon, patkányokon és majmokon). Ugyanakkor kevés szakirodalmi adat áll rendelkezésre afrikai karmosbékán (*Xenopus laevis*) végzett kísérletekről annak ellenére, hogy kiváló tesztszervezet a teratogén hatások tanulmányozására.

A kísérleti berendezések kialakítását, a kísérlet pontos menetét és módját az ASTM (American Society for Testing and Materials) E1439-98 számú standardizált protokolljában (96 órás FETAX-teszt) leírtak alapján végeztük el.

Eredményeink igazolták, hogy a szulfametoxazol és a ketoprofen egyaránt teratogén hatású az afrikai karmosbéka modellben. A vizsgálat során a lárvákban túlnyomó többségben axiális deformációk és ödémaképződések voltak megfigyelhetők. A szulfametoxazol 150 mg/l-es koncentrációja a vizsgált embriók 17,39%-ában, míg 250 mg/l-es koncentrációja az embriók 32,95%-ában gerincoszlop ferdülést okozott. A ketoprofen 10 mg/l koncentrációban ödémaképződést idézett elő a kezelt embriók 77,55%-ában. Az arcorri tájék deformációi, a szem-, a bélfejlődési és pigmentképzési rendellenességek csak kis számban fordultak elő. A szulfametoxazol 250 mg/l-es koncentrációjával történő kezelés hatására egy kétfejű embrió megjelenését is leírtuk.

A statisztikai számítások alapján a ketoprofen LC_{50} értéke 12,1 mg/l, az EC_{50} pedig 5,67 mg/l volt a 96 órás FETAX-tesztre vetítve. A ketoprofen 15 mg/l-es koncentrációjának alkalmazásakor 90%-os mortalitást figyeltünk meg. A szulfametoxazol esetében az LC_{50} és EC_{50} értékeket az alacsony mortalitás miatt nem célszerű kiszámolni, értékelhető eredményeket csak az LC_{10} (200 mg/l) és EC_{10} (132,85 mg/l) szinteken kaptunk.

Adataink hozzájárulhatnak a különböző hatóanyagok biztonságosabb és hatékonyabb felhasználásához a gyógyászatban, és reméljük, hogy eredményeink az élelmiszerbiztonság kérdéseihez is adatokat szolgáltatnak.

További vizsgálatok szükségesek az eredményeink igazolására, főleg a ketoprofen esetében, illetve újabb hatóanyagok bevonásával folytatni kívánjuk a kísérletsorozatot.

7. SUMMARY

The series of experiments discussed in this paper were undertaken as a part of eco- and clinical toxicology listed in experiment profile of the Department of Veterinary Public Health and Toxicology Laboratory at the University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences in Brno.

The objective of present research, the toxic, mutagenic and teratogenic effects of ketoprofen and sulfamethoxazole, have been increasingly studied in various animal species (fishes, frogs, rats and monkeys), there remains much to be concluded. In particular, not much literature with research data is available on African clawed frog (*Xenopus laevis*), although it is an important model organism for studies of the teratogenic effects.

The equipment and experiments were designed and conducted as described in American Society for Testing and Materials (ASTM) E1439–98 (96-hour FETAX test).

Results from the present study demonstrate that ketoprofen and sulfamethoxazole have equally a potential of teratogenic effects on model of African clawed frog. An overwhelming majority of axial abnormalities and occurrences of edema were observed in larvae during our research. At sulfamethoxazole concentrations of 150 mg/L and 250 mg/L a spinal curvature was detected in 17.39 and 32.95% of tested frog embryos, respectively. At ketoprofen concentration of 10 mg/L an occurrence of edema was found in 77.55% of frog embryos used in these experiments. In small number of cases, the malformation of face, eye, gut and pigment abnormalities have occurred. The treatment of frog embryos with sulfamethoxazole concentration of 250 mg/L produced also a two-headed tadpole.

All statistical data were calculated with ketoprofen LC_{50} and EC_{50} values (12.1 mg/L and 5.67 mg/L) in 96-h FETAX. About 90% of mortality was reported, when using ketoprofen concentration of 15 mg/L. Since 50% lethality was not observed even at the highest tested doses of sulfamethoxazole, LC_{10} (200 mg/L) and EC_{10} (132.85 mg/L) values were estimated as endpoints.

These data may contribute to safe and effective use of different active substances in medicine. We hope that our findings will be used to provide baseline data for food safety issues. Further studies are needed to confirm these findings, especially in the case of ketoprofen, and we plan to continue in series of experiments involving new active substances.

8. IRODALOMJEGYZÉK

- ADAMS, H. R. (ed.) 1995: Veterinary Pharmacology and Therapeutics. Iowa: Iowa State University Press, Ames. 1181 p.
- ALARCON DE LA LASTRA C. et al. 2002: Oligoethylene ester derivatives of ketoprofen, naproxen and diclofenac as oral prodrugs: a pharmacological evaluation. *Inflammation Research*. 51. vol. 2. no. p. 51-57.
- ALDER A. C. et al. 2001: Occurrence and Fate of Flouroquinolone, Macrolide, and Sulfanamide Antibiotics During Wastewater Treatment and in Ambient Waters in Switzerland. *American Chemical Society*. 791. Symposium Series, p. 56-69.
- ASTM (American Society for Testing and Materials) 1998: Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay- *Xenopus* (FETAX). E 1439- 98.
- AVOUAC B., TEULE M. 1988: Ketoprofen: the European experience. *The Journal of Clinical Pharmacology*. 28. vol. 12. no. p. 2–7.
- AWAN A.F. et al. 2011: Studies of ketoprofen toxicity in avian species. *Journal of Basic and Applied Sciences*. 7. vol. 2. no. p. 127-132.
- BANTLE J. A. et al.: Atlas of Abnormalities: A Guide to the Performance of FETAX. Stillwater, Oklahoma: OSU Press, 1998. 2nd ed. 71p.
- BANTLE J.A., RAND G. M. (ed.): Fundamentals of Aquatic Toxicology. Washington, D.C.: Taylor and Francis, 1995. 207-230 p.
- BIALK H. M. et al. 2005: Cross-coupling of sulfonamide antimicrobial agents to model humic constituents. *Environmental. Science and. Technology*. 39. vol. 12. no. p. 4463-4473.
- BOYNTON C. S. et al. 1988: NSAIDs: an overview. *The Journal of Clinical Pharmacology*. 28. vol. 6. no. p. 512-517.
- BRACKEN M. B., HOLFORD T. R. 1981: Exposure to prescribed drugs in pregnancy and association with congenital malformations. *Obstetrics and gynecology*. 58. vol. 3. no. p. 336–344.
- BUSER H. R. et al. 1999: Occurrence and Environmental Behavior of the Chiral Pharmaceutical Drug Ibuprofen in Surface Waters and in Wastewater. *Environmental Science and Technology*. 33. vol. 15. no. p. 2529-2535.
- CANNATELLA D. C., DE SA R. O. 1993: *Xenopus laevis* as a model organism. *Systematic Biology*. 42. vol. 4. no. p. 476-507.
- CARLSSON C. et al. 2006: Are pharmaceuticals potent environmental pollutants? Part I: Environmental risk assessments of selected active pharmaceutical ingredients. *Science of Total Environment*. 364. vol. 1-3. no. p. 67-87.

- COHEN H. N. et al. 1980: Effects on human thyroid function of sulphonamide and trimethoprim combination drugs. *British Medical Journal*. 281. vol. 6241. no. p. 646–647.
- COOK M. J., FAIRWEATHER A. F. 1968: Methods used in teratogenic testing by Department of Drug Toxicity Evaluation and Pathology. *Laboratory Animals*. 2. vol. 13. no. p. 219-228.
- CREW F. A. E. 1939: Biological pregnancy diagnosis tests: A comparison of the rabbit, the mouse, and the 'clawed toad' (*Xenopus laevis*) as the experimental animal. *British Medical Journal*. 1. vol. 4084. no. p. 766-770.
- CUNNINGHAM H. et al. 2006: Effects of Human Pharmaceuticals on Aquatic Life: Next Steps, *Environmental Science and Technology*. 40. vol. 11. no. p. 3456–3462.
- DÍAZ-CRUZ M. S. et al. 2003: Environmental behaviour and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge. *Trends in Analytical Chemistry*. 22. vol. 6. no. p. 340-351.
- FINNELL R. H. 1999: Teratology: General considerations and principles. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 103. vol. 2. no. p. 337-342.
- GABRIEL S. E. et al. 1991: Risk for serious gastrointestinal complications related to use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. A metaanalysis. *Annals of Internal Medicine*. 115. vol. 10. no. p. 787-796.
- GARCIA RODRIGUEZ L. A. 1998: Variability in risk of gastrointestinal complications with different nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *American Journal of Medicine*. 104. vol. 3. no. p. 30-34.
- GARVEY N. : *Xenopus laevis*. International Journal of Developmental Biology, 2000. 44. vol. p. 43-50. URL: http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Xenopus_laevis.html. Letöltés ideje: 2011. 08.27.
- GILL H. J. et al. 1997: The Relationship Between the Disposition and Immunogenicity of Sulfamethoxazole in the Rat. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 282. vol. 2. no. p. 795–801.
- GRUIZ K.(szerk.) et al.: Környezettoxikológia: Vegyi anyagok hatása az ökoszisztámára. Budapest: Műegyetemi Kiadó, 2001. 159 p.
- GURDON J. B., HOPWOOD N. 2000: The introduction of *Xenopus laevis* into developmental biology: of empire, pregnancy testing and ribosomal genes. *International Journal of Developmental Biology*. 44. Vol. p. 43-50.
- GUTHRIE D.: The History of Medicine. Philadelphia: Lippincott, 1958. 2nd ed. 463 p.
- HADIPOUR M. M. et al. 2011: Treatment of Joint Inflammatory Diseases in the Lamé Backyard Chickens with NSAIDs. *International Journal of Animal and Veterinary Advances*. 3. vol. 2. no. p. 73-76.

- HALLARE A. V. et al. 2004: Developmental toxicity and stress protein responses in zebrafish embryos after exposure to diclofenac and its solvent, DMSO. *Chemosphere*. 56. vol. 7. no. p. 659-666.
- HALLING-SØRENSEN B. 2001: Inhibition of aerobic growth and nitrification of bacteria in sewage sludge by antibacterial agents. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 40. vol. 4. no. p. 451-460.
- HIRSCH R. et al. 1999: Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *Science of The Total Environt.* 12. vol. 1-2. no. p. 109-118.
- HOKE R. A., ANKLEY G.T. 2005: Application of frog embryo teratogenesis assay-*Xenopus* to ecological risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 24. vol. 10. no. p. 2677–2690.
- HUNTER R. P. et al. 2003: Oral bioavailability and pharmacokinetic characteristics of ketoprofen enantiomers after oral and intravenous administration in Asian elephants (*Elephas maximus*). *American Journal of Veterinary Research*. 64. vol. 1. no. p. 109-114.
- ISIDORI M. et al. 2005: Toxic and genotoxic evaluation of six antibiotics on non-target organisms. *Science of The Total Environment*. 346. vol. 1- 3. no. p. 87-98.
- KEMPER N. et al. 2008: Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecological Indicators*. 8. Vol. 1. no. p. 1-13.
- KISS I. (szerk.), VÁRNAGY L. 1997: Toxikológia. Veszprém: Veszprémi Egyetemi Kiadó. 206 p.
- KOSS R., WAKEFORD B. 2001: Rearing *Xenopus laevis* life history stages. In: KARCHER S.J.(ed.): Tested studies for laboratory teaching. 22nd Proceedings of the, Workshop/Conference of the Association for Biology Laboratory Education (ABLE), p. 387-393.
- Környezetvédelmi információ: Ketoprofen: <http://enfo.agt.bme.hu/drupal/node/2914>. Letöltés ideje: 2011. 10. 17.
- Környezetvédelmi információ: Szulfametoxazol: <http://enfo.agt.bme.hu/drupal/node/2915>. Letöltés ideje: 2011. 10. 17.
- LANDGREBE F. W. 1939: The maintenance of reproductive activity in *Xenopus laevis* for pregnancy diagnosis. *Journal of Experimental Biology*. 16. vol. p. 89-95.
- LUO S. Q. et al. 1993: Mg¹²-deprivation enhances and Mg¹²-supplementation diminishes the embryotoxic and teratogenic effects of Ni¹², Co¹², Zn¹², Cd¹² for frog embryos in the FETAX assay. *Annals of Clinical and Laboratory Science*. 23. vol. 2. no. p. 121–129.
- MACALLISTER C. G. et al. 1993: Comparison of adverse effects of phenylbutazone, flunixin meglumine and ketoprofen in horses. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 202. vol. 1. no. p. 71-77.

- MADUREIRA T. V. et al. 2011: The toxicity potential of pharmaceuticals found in the Douro River estuary (Portugal)—Experimental assessment using a zebrafish embryo test. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 32. vol. 2. no. p. 212-217.
- MARTÍNEZ-CARBALLO C. et al. 2007: Environmental monitoring study of selected veterinary antibiotics in animal manure and soils in Austria. *The Polish Journal of Environmental Studies*. 148. Vol. 2. no. p. 570–579.
- MÜCKTER H. 2006: Antibiotika-Rückstände im Trinkwasser. 47. Arbeitstagung des Arbeitsgebiets Lebensmittelhygiene, Garmisch-Patenkirchen.
- NAIDOO V. et al. 2010: The toxicokinetics of ketoprofen in Gyps coprotheres: Toxicity due to zero-order metabolism. *Archives of Toxicology*. 84. vol. 10. no. p. 761-766.
- NIEUWKOOP P. D. 1961: “L’Institut International d’Embryologie” (1911-1961). Held in the Central Embryological Collection, Hubrecht Laboratory, Utrecht. 7 p.
- NIEUWKOOP P. D., FABER J. 1994: Normal Table of *Xenopus Laevis* (Daudin). New York and London: Garland Publishing Inc., 282 p.
- OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) 2004: Final draft detailed review paper on amphibian metamorphosis assay for the detection of thyroid active substances. OECD 46. p. 107.
- PAULI B. D. et al. 2000: RATL: A Database of Reptile and Amphibian Toxicology Literature. Canadian Wildlife Service, Headquarters, Hull, Québec, Canada. Technical Report Series no. 357. p. 494.
- SACHER F. T. et al. 2001: Analytical methods and results of a monitoring program in Baden-Württemberg, Germany. *Journal of Chromatography*. 938. vol. p. 199–210.
- SOMMER A. 2008: Vitamin A Deficiency and Clinical Disease: An Historical Overview. *Journal of Nutrition*. 138. vol. 10. no. p. 1835-1839.
- SUSAN K. et al. 2003: Elephant formulary. Elephant Care International. URL: <http://www.elephantcare.org>. Letöltés ideje: 2011. 09.28.
- SUZUKI Y. et al. 2006: Occurrence of Pharmaceuticals and personal care products in wastewater systems. Water Quality Research Team, Water Environment Research Group, Public Works Research Institute. URL: <http://www.niph.go.jp/soshiki/suido/pdf/h19JPUS/abstract/r18.pdf>. Letöltés ideje: 2011. 10. 2.
- SWARM R. L. et al 1973: Observations on the thyroid gland in rats following the administration of sulfamethoxazole and trimethoprim. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 24. vol. 3. no. p. 351–363.

- SWINKELS J. M. et al. 1994: Effects of ketoprofen and flunixin in pigs experimentally infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 17. vol. 4. no. p. 299-303.
- TAKAYAMA S. et al. 1986: Antithyroid effects of propylthiouracil and sulfamonomethoxine in rats and monkeys. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 82. vol. 2. no. p. 191–199.
- THIENPONT B. et al. 2011: Zebrafish Eleutheroembryos Provide a Suitable Vertebrate Model for Screening Chemicals that Impair Thyroid Hormone Synthesis. *Environmental Science and Technology*. 45. vol. 17. no. p. 7525–7532.
- TIETGE J. E. et al. 2000: Effects of water quality on development of *Xenopus laevis*: A FETAX assessment of surface water associated with malformations in native anurans. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 19. vol. 8. no. p. 2114–2121.
- TRIEBSKORN R. et al. 2004: Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac. Part II: cytological effects in liver, kidney, gills and intestine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*. 68. vol. 2. no. p. 151-166.
- U.S. Environmental Protection Agency 1998: Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC) Report. Office of Pollution Prevention and Toxic Substances, Washington, DC. URL: <http://www.epa.gov/scipoly/sap/1998/may/edstac/> Letöltés ideje: 2011.08.30.
- VRŠKOVÁ D.: Disszertációs munka: Využití drápatky vodní (*Xenopus laevis*) v ekotoxikologických biotestech. Brno, 2005.
- WILSON, J. G. 1973: Environment and Birth Defects (Environmental Science Series). London: Academic Press. 1924 p.
- YANG L. H. et al. 2008: Growth-inhibiting effects of 12 antibacterial agents and their mixtures on the freshwater microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 27. vol. 5. no. p. 1201-8.
- YARGEAU V. et al. 2008: Impact of degradation products of sulfamethoxazole on mammalian cultured cells. *Environmental Toxicology*. 23. vol. 4. no. p. 492–498.

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném őszinte köszönetemet kifejezni Dr. Lehel Józsefnek, hogy munkámat témavezetőként irányította, felmerülő kérdéseimre mindig válaszolt és lehetővé tette, hogy dolgozatomat a Gyógyszertani és Méregtani Tanszéken készíthessem el. Köszönettel tartozom Dr. Baska Ferencnek is, ugyancsak témavezetőmnek, az értékes meglátásaiért és a dolgozat elkészítésében nyújtott instruálásért.

Az eredményeink statisztikai elemzését köszönöm Dr. Reiczigel Jenő professzor úrnak.

Végül, köszönöm a Brünni Állatorvos-tudományi és Gyógyszerészeti Egyetem Közegészségügyi és Toxikológiai Intézet dékánhelyettes asszonyának, MVDr. Vladimíra Pištěkovának, hogy lehetővé tette az Intézetben zajló kutatásokon való részvételemet. A nyári kutatói munka nélkül a bemutatott dolgozatom nem születhetett volna meg. Különösképpen köszönöm MVDr. Dagmar Vršková állatorvosnak és MVDr. Helena Modrá docensasszonynak a dolgozatomban bemutatott kísérletek közös kivitelezését és az eredmények kiértékelésénél kapott hasznos tanácsokat.