

SZENT ISTVÁN EGYETEM
MEZŐGAZDASÁG- ÉS KÖRNYEZETTUDOMÁNYI KAR
KÖRNYEZET- ÉS TÁJGAZDÁLKODÁSI INTÉZET
HALGAZDÁLKODÁSI TANSZÉK

ÖSZTROGÉN HATÁSÚ ANYAGOK VIZSGÁLATA TRANSZGENIKUS ZEBRADÁNIÓ
(*DANIO RERIO*) VONALAKON

*Examining the effects of estrogenic compounds on transgenic zebrafish lines (*Danio rerio*)*

Készítették:

Horváth Bea Réka

(Állattenyésztő mérnök BSc II.évf.)

Horváth Alexandra

(Állattenyésztő mérnök BSc II.évf.)

Témavezetők:

Bakos Katalin

(Tanszéki mérnök)

Dr. Csenki Zsolt

(Tanszéki mérnök)

Tartalom

1.	Bevezetés és célkitűzés	3
1.1	Bevezetés.....	3
1.2	Célkitűzés	3
2.	Irodalmi áttekintés	4
2.1	Környezetszennyezés, természetes vizekbe jutó szennyezőanyagok	4
2.1.1	Természetes vizekbe kerülő, endokrin rendszert megzavaró anyagok (EDC-k).....	5
2.2	Toxikus anyagok vizsgálata	11
3.2.1	Modellállatok szerepe a biológiai vizsgálatokban	13
3.	Anyag és módszer	18
3.1	Felhasznált állatok	18
3.2	Zebradánio embriók nyérése	18
3.3	Zebradánio embriók kezelése ösztrogén hatású anyagokkal.....	18
3.3.1	Ösztrogén (17- β -ösztradiol)	18
3.3.2	Atrazin.....	19
3.3.3	Biszfenol-A	19
3.4	Mikroszkópos vizsgálatok.....	19
4.	Eredmények és értékelés	21
4.1	Kontroll egyedek	21
4.2	Ösztrogén kezelés eredményei	24
4.3	Atrazin kezelés eredményei	27
4.4	Biszfenol-a kezelés eredményei	30
4.5	Következtetések és javaslatok	32
5.	Összefoglalás	34
6.	Köszönetnyilvánítás	35
7.	Irodalomjegyzék.....	36

1. Bevezetés és célkitűzés

1.1 Bevezetés

Az ipar és a mezőgazdaság fejlődésével egyre többféle vegyi anyag jut a környezetbe, amelyek között számos nagy mennyiségben kijutó, a hormonháztartást megzavaró ösztrogén hatású anyag is található. A kikerülő szennyezőanyagok veszélyeztetik az érintkező élő szervezeteket, ezért kimutatásuk és hatásuk vizsgálata nagy jelentőséggel bír.

A vér és érrendszer a legfontosabb toxikológiai célszervek közé tartoznak, mélyrehatóbb morfológiai vizsgálatuk csaknem minden esetben (kivéve vérvétel) a kísérleti állatok feláldozásával jár. A laboratóriumi állatokon végzett kísérletek tervezésekor azonban egyre inkább követelmény a vizsgálatok helyettesítése, csökkentése és finomítása (3R stratégia).

A zebradánió (*Danio rerio*) évtizedek óta az egyik legáltalánosabban használt laboratóriumi modellállat. Embrióit és lárváit a táplálkozó kor eléréséig az Európai Unióban hatályos állatvédelmi szabályok nem tekintik élő állatnak. Mivel ebben a stádiumban a lárvák még átlátszóak, a fluoreszcens fehérjét kifejező transzgenikus vonalakban a jelölt célszervek jól láthatóak, így lehetővé teszik azok *in vivo* vizsgálatát ugyanazon egyedben eltérő időpontokban, az állat feláldozása nélkül.

1.2 Célkitűzés

Kísérleteink során ösztrogén hatású anyagok hatását vizsgáltuk a vérben vörös (DsRed) és az érrendszerben zöld (EGFP) fluoreszcens fehérjét kifejező transzgenikus zebradánió vonalakon. 4 napon át (3 napos korig) kezeltük a termékenyülést követően az embriókat és detektáltuk a kialakuló rendellenességeket. A vizsgálat elő kísérlet, ezért a környezetben előforduló koncentrációknál nagyobb koncentrációkat használtunk, hogy vizsgáljuk, a vonalak valóban alkalmasak-e a kijelölt vizsgálatokra. A transzgenikus vonalat a későbbiekben a Halgazdálkodási Tanszék egyik kutatási munkájához, egy többszínű, ösztrogén hatású anyagokra érzékeny transzgenikus zebradánió vonal létrehozásához kívánjuk felhasználni.

2. Irodalmi áttekintés

2.1 Környezetszennyezés, természetes vizekbe jutó szennyezőanyagok

A környezetszennyezés régebben létezik, mint a civilizáció, amióta a Földön megjelent az ember azóta termelünk fizikai és kémiai hulladékot, amely megváltoztatja a természetes vizeink, a levegő és a talaj eredeti összetételét. Természetes vizeink védelme nagyon fontos az emberiség szempontjából, mert vizeink szennyezése nem csak az ott élő ökoszisztémát, hanem az emberek tiszta ivóvízhez jutását is veszélyezteti. (Markham 1994)

Földünk édesvízkészletének kevesebb, mint 1%-a hasznosítható közvetlenül ivóvízként, és igaz, hogy az édesvíz megújuló forrás, de a klímaváltozás és a mértéktelen szennyezés következtében az ember számára hozzáférhető tiszta víz mennyisége is folyamatosan csökken. A természetes vizek szennyezése régóta visszanyúló probléma, korábban azonban közel sem volt ilyen jelentőségű, mivel a kisebb mértékű szennyezést a természet még képes volt „semlegesíteni” fizikai és/vagy kémiai folyamatok révén.

Ezen folyamatok során a szennyezőanyagok felhígulnak, kiülednek, majd a mikroorganizmusok közvetlenül felhasználják, lebontják azokat. Mára azonban a városok, a mezőgazdaság és az ipar által közvetlenül és közvetve a vizekbe jutó szennyezés mértéke jóval meghaladja a vizek természetes öntisztuló képességét. Egyes becslések szerint a fejlett ipari országok 2-3-szor annyi vizet használnak, mint amennyit a természetes vízkörforgás biztosít. Emiatt fokozódó mértékben hasznosítják a rétegvíz tartalékokat, ami a talajvíz szintjének csökkenésével jár, és egyre nagyobb mértékben kell a vízhiányt szennyezett felszíni vizek költséges tisztításával is fedezni. (Szalai 1987)

A szennyezés egy része a háztartásokból származó kommunális szennyvízzel, nagy része az ipari és a mezőgazdasági tevékenység révén jut a természetes vizekbe. A háztartások által kibocsátott, főként a WC-k öblítéséből, mosásból, mosogatásból és tisztálkodásból származó kommunális szennyvíz szerves anyagokat és fertőző mikroorganizmusokat tartalmazhat. A különböző felületaktív anyagokat tartalmazó mosószerek, de az olajszennyezés is a vizek felületén elterülve megakadályozhatják az oxigén beoldódását. A különböző gyárakban és üzemekben keletkező szennyvíz szintén nagymértékben tartalmazhat mérgező anyagokat. A kibocsátott szerves szennyezőkön kívül szervetlen mikroszennyezőket, például fémeket tartalmazhat, amelyek vízbe kerülése szintén komoly veszélyt jelent. Egyes fémek kis mennyiségben szükségesek az élővilág számára, ezeket esszenciális fémeknek nevezzük, ilyen például a bór, a cink, a mangán. Néhány (pl. higany, kadmium) már nagyon kis mennyiségben is toxikus és feldúsulhat a táplálékláncban. Az esszenciális fémek az optimálist jóval meghaladó koncentrációban, valamint a nem esszenciálisak

növekvő koncentrációban fokozottan mérgezőek. Mindezek mellett a hőszennyezés is komoly problémákat okozhat, főleg atomerőművek és ipari telepek mellett. A víz hőmérséklete megnövekszik, amelynek hatására a vízben az oldott oxigén koncentrációja csökken. Ez a kevésbé oxigénigényes fajoknak kedvez, ami az ökoszisztéma felborulásához vezet. (Vallner 2004)

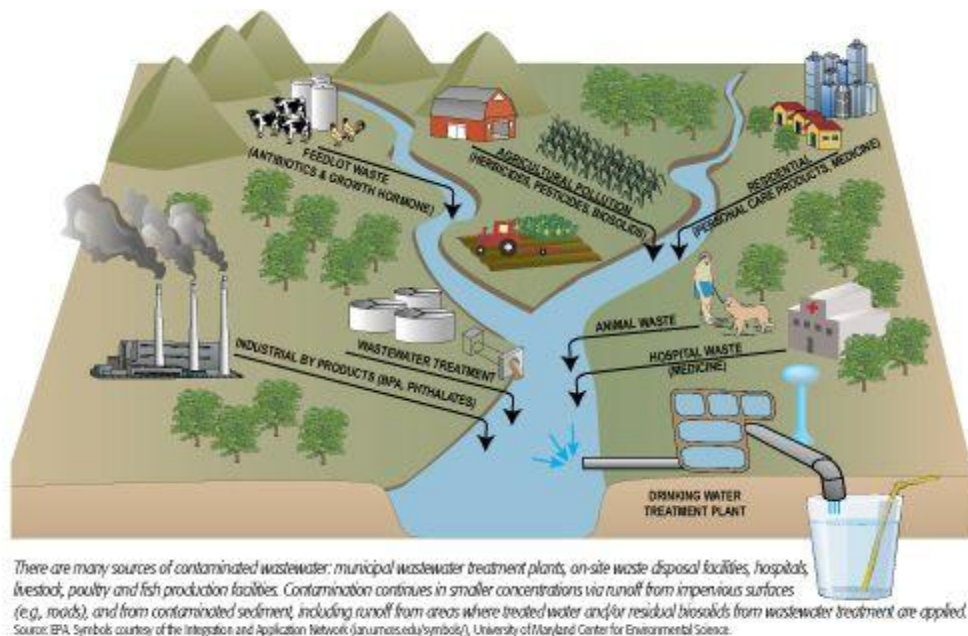
A mezőgazdasági tevékenység egyrészt a növények számára tápanyagot jelentő nitrogén és foszfor kibocsátásával jelent veszélyt, ami a tavak eutrofizációjához vezet. Ennek során a fotoszintetizáló növények (pl. algák) elszaporodnak, majd bomlásuk során elfogy a vízben oldott oxigén, aminek következtében a halak elpusztulnak. Másrészt nagy veszélyt jelent a nagy mennyiségben kipermetezett növényvédő szerek vizekbe szivárgása, amelyek az élő szervezetekben, így az emberben is felhalmozódnak és több évtizedig mérgezőek maradhatnak (Internet I.)

2.1.1 Természetes vizekbe kerülő, endokrin rendszert megzavaró anyagok (EDC-k)

Az EPA (Environmental Protection Agency) definíciója szerint: „az endokrin diszruptor anyagok beavatkoznak a homeosztázis fenntartásáért, a reprodukcióért, az utódok fejlődéséért és/vagy viselkedéséért felelős természetes hormonok szintézisébe, szekréciójába, transzportjába, kötődésébe, hatásába, vagy eliminációjába”.

A hormonokhoz hasonló hatást fejtenek ki, és ezzel megzavarják az endokrin rendszer normális működését. Az EDC anyagok (Endocrine Disrupter Chemicals) a hímivarú egyedek elnőiesedéséhez vezethetnek, valamint károsítják az ideg- és az immunrendszert, illetve több tumoros megbetegedés, így a mell-, here- és prosztatarák kialakulásához is hozzájárulhatnak. Szaporodást, immunrendszert, fejlődést befolyásoló és gátló hatásukat már számos állatfaj esetében megfigyelték. (Juvancz 2011)

Az EDC hatású anyagok használata olyan széles körben elterjedt, hogy gyakorlatilag a legtudatosabb életmód mellett sem tudjuk elkerülni, legfeljebb csökkenteni az ezekkel való érintkezést a mindennapi tevékenységeink során. Napjainkban egyre nagyobb mennyiségben kerülnek ki a környezetbe, nagyrészt antropogén forrásokból: mezőgazdasági tevékenység során szennyezett takarmánnyal vagy trágyával, növényvédőszerrel, rovarirtó szerek használatával, ipari tevékenység következtében, valamint a háztartásokból gyógyszermaradványokkal, mosó- és mosogatószerrel, kozmetikumokkal, festékekkel és műanyag adalékokkal, háztartási hulladékként, szennyvíztisztítókból vagy ipari szennyvíz révén (1. ábra). Ezek az anyagok természetes vizekbe jutva veszélyeztetik, károsítják a vízzel érintkező ökoszisztémákat és szervezeteket, az ivóvízkészleten keresztül pedig az embert is. (Petrovic et al. 2004)



1. ábra: A vízbe kerülő, endokrin rendszert megzavaró anyagok forrásai
<http://www.potomac.org/site/SONR-2009/index.php>

Ösztrogén hatású anyagok lehetnek természete eredetű ösztrogének (mikoösztrogének, fitoösztrogének, állati eredetű szexuálisztroidok) vagy mesterséges anyagok, ún. xenoösztrogének (gyógyszerek és gyógyszermaradványok, ipari eredetű szennyezők, növényvédőszer). (Internet II.) A legfontosabb xenoösztrogének:

- Alkilfenolok és származékai: samponnal vagy műanyagokkal való érintkezés során jutnak a környezetbe
- Ftalátok: kozmetikai szerekkel, mosogatószerrel kerülhetnek a környezetbe
- Biszfenol-A: antioxidánsként, műanyagok gyártásánál adalékanyagként vagy akár fogtömésekben is használhatják
- PCB vegyületcsoport (poliklórozott bifenilek): hűtőadó folyadékként, hidraulikus rendszerekben, kenőanyagokként, ill. festékekben, ragasztókban, tömítő- és szigetelőanyagokban, valamint lágyító anyagként műanyagokban és vízálló anyagként, portalanító szerként és NCR (nem széntartalmú) másoló papírhoz is használják
- Égéstermékek
- Dioxinok
- Rovarirtók
- Gyógyszerek
- Fémek és fémtartalmú vegyületek (nehézfémek)
- Hozamnövelő szteroidok (élelmiszerek közül a tej- és húskészítményekben találhatóak)

- Izo flavon vegyületek (szójából készült termékek)
- Fájdalomcsillapítók, gyulladáscsökkentők, antibiotikumok, valamint a fogamzásgátlók (a gyógyszerek hatóanyagának viszont csak alig fele hasznosul a szervezetben, mintegy 40-60%-a vizelettel vagy széklettel, szinte érintetlenül kiürül a szervezetből, és a szennyvízbe jut) (Petrovic et al. 2004)

Mivel az EDC-k felhalmozódhatnak a szervezetben, nem csak az „elsődleges fogyasztókra”, hanem a tápláléklánc többi tagjára is hatással vannak. Az eddigi kutatások kimutatták, hogy az EDC-k hatására az élőlényközösségeken belül eltolódhat a nemek aránya a nőstények javára. A vízi élővilágban, így például a halaknál vagy a békáknál is felborul a szaporodási rendszer, ami megváltoztatja az egész táplálkozási láncot. (Berrill 2003)

Az EDC hatású anyagok felismerésének több nehézsége is van. Egyesek csak bizonyos fajokra hatnak. Gyakran csak bizonyos életkorokban veszélyesek: embrió, újszülött, pubertás és a terhesség időszakában. Több generáción keresztül jelentkezik a hatásuk. Számos közülük perzisztens, biomagnifikációra hajlamos.

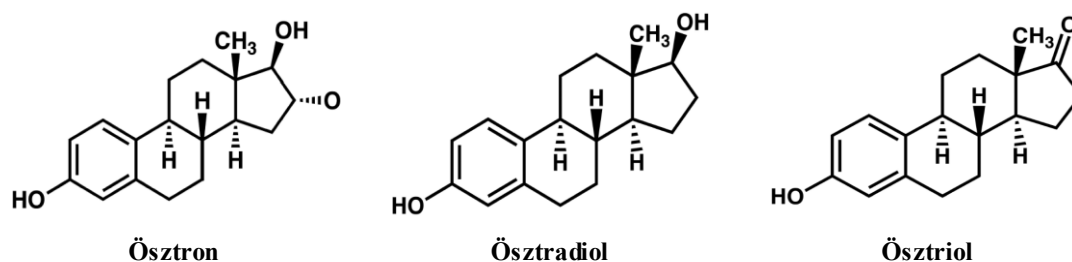
Legkönnyebben észlelhetőek a közvetlenül nemi hormonokat érintő hatások, amelyek a nemek átfordulásában, abnormális nemi viselkedésben és a nemek arányának eltolódásában jelentkeznek. Az ösztrogén hatású anyagok kis koncentrációban csak vitellogenin termelést eredményeznek, nagyobb koncentrációban azonban a hímek már ikrát is raknak. Ikra állapotban és ivarérett kor előtt adott ösztrogén a hím halakt funkcionális nőstényekké vagy hermafroditákká alakította. Madaraknál és halaknál az endokrin rendszert károsító anyagok kóros pajzsmirigyműködést okoztak. Csökkent termékenyülő képességet madaraknál, halaknál, kígyóknál és emlősöknél figyeltek meg eddig. Halaknál, madaraknál és teknősöknél kelési sikertelenség jelentkezett. Csigáknál, madaraknál és emlősöknél immunrendszer működési zavarokat okozhatnak a káros vegyi anyagok. (Dickerson et al. 2007, Crain et al. 2008, Anway et al. 2006)

2.1.1.1 Ösztrogén

Az ösztrogén, vagy tüszőhormon szteroid vegyületek kombinációja. Az ösztrogénciklusban van szerepe, valamint ez a legfontosabb női nemi hormon. A petefészekben, a méhlepényben és a herékben termelődik. Elsősorban női nemi hormon, de csekély mennyiségben a férfiak szervezetében is előfordul, ahol a hímivarsejtekérésében játszik szerepet. Az ösztrogén legfőbb szerepe a másodlagos női nemi jellegek kialakítása és a reprodukciós ciklus szabályozása. Emellett részt vesz a szervezet fejlődésével összefüggő más folyamatokban is, így például a csöves csontokérésében és növekedésében. Másodlagosan alacsonyabb koncentrációban, más szövetekben, például

a mellékvesében, a májban és az emlő sejteiben termelődik. Ezen felül kis mennyiségben termelődik ösztrogén a zsírszövetekben, izmokban és a csontszövetekben. Az ösztrogén a véráramban kering és megkötöti az ösztrogén receptorokat. A szövetekben ezek a receptorok több helyen is megtalálhatók. (Nelson and Bulun 2001)

Az ösztrogént szájon át alkalmazható fogamzásgátlókban, menopauza utáni nők ösztrogénpótlása céljából és transzszexuális nők hormonkezelése céljából alkalmazzák. Mint minden szteroid hormon, az ösztrogén is átjut a sejtek membránján és az ösztrogén receptorhoz kötődve fokozza egyes gének működését. Az ösztrogén hormonok közé három hormon sorolható: az öszttron, az öszttradiol és az öszttriol (2. ábra). (Whitehead and Nussey 2001)



2.ábra: A szervezetben előforduló ösztrogének szerkezeti képlete
<http://hu.wikipedia.org/wiki/T%C3%BCsz%C5%91hormon>

Ezek az anyagok felgyorsítják az anyagcserét, csökkentik az izomtömeget, növelik a zsírraktározás mértékét, serkentik az endometrium növekedését, serkentik a méh növekedését és ezáltal a méh fala is megvastagodhat, növelik a csontképződést, morfikus változásokat okozhatnak, növelik a májban előállított fehérjék számát, növelhetik az epében lévő koleszterint, csökkenthetik a bél motilitását, elősegíthetik a szervezetben a rák megjelenését. (Fang et al. 2001)

Az ösztrogének lebontása és kiürülése a szervezetből hidroxilációs folyamatok révén valósul meg, amelyért a P-450 enzim felel. Két bomlástermék keletkezhet: a 2-hidroxi-ösztrogén, valamint a 16-hidroxi-öszttron. Ez utóbbi a szervezetre nézve káros. A két bomlástermék aránya jelentős mértékben befolyásolja a hormonfüggő daganatok kialakulásának kockázatát. (Internet III.) A bomlástermékek a szervezetből a vizelettel ürülnek. A hormonhatású anyagok, így az ösztrogének is minimális mértékben, de oldódnak vízben. Hormonhatású készítmények szedése esetén a vegyületek koncentrációja nőhet a vizeletben, és így nagyobb mennyiségben is a környezetbe kerülhet, ahol a mikroorganizmusok nem képesek lebontani. Ezért az egyik legismertebb vízszennyező az ösztrogén. A környezetben tehát a szintetikus ösztrogének mellett a leggyakrabban az öszttriol és az öszttron fordul elő. A jelenlegi ivóvíz-tisztítási eljárások még nem veszik

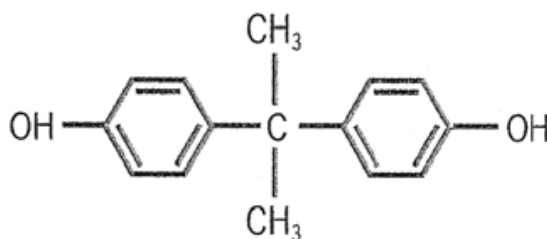
figyelembe a vizek 17- β -ösztradiol tartalmát. Bizonyos szennyeződések a közösségi szűrőberendezések nem képesek kitisztítani. (Wise et al. 2010)

Ivóvíz fogyasztáskor kisebb vagy nagyobb mértékben hormonok is kerülnek így az élő szervezetbe, ami nemcsak az állati szervezeteket, de az embert is veszélyezteti. Halakban és más szervezetekben kimutatták, hogy a környezeti ösztrogén káros hatással van a szaporodóképességre, valamint terméketlen hímek és nőstények megjelenését idézi elő.

Európában a tisztított szennyvízzel kikerülő 17- β -ösztradiol és ösztroon koncentrációja néhány ng/l-től a több száz ng/l-ig változik (Desbrow et al. 1988, Baronti et al. 2000), míg ez az adat az USA területén a kimutatási küszöb alatti mennyiségtől 3,7 ng/l-ig változik (Synder et al. 1999). Nagy-Britannia folyóiban nem ritka, hogy a vízhozam közel felét a beömlő tisztított szennyvizek teszik ki. Az elfolyó vizek gyakran 100 ng/l feletti ösztrogénkoncentrációval rendelkeznek, a felszíni vizekben kialakuló koncentráció függ a beömlés helyétől való távolságtól, a víz mikrobiális aktivitásától, valamint különféle fizikokémiai jellemzőktől. Főként az ösztradiol felelős az angliai tisztított szennyvizek ösztrogén-aktivitásáért. (Desbrow et al. 1998)

2.1.1.2 Biszfenol-A

Biszfenol-A (BPA) egy két fénol csoportot tartalmazó szerves vegyület (3. ábra).



Biszfenol-A

3.ábra: A biszfenol-A szerkezeti képlete

(http://en.wikipedia.org/wiki/File:Bisphenol_A.svg)

A biszfenol-A (BPA) szintetikus vegyület, amelyet főként polikarbonát műanyagok és epoxigyanták, 10%-ban speciális vegyszerek, például a lánggátló tetrabrom-biszfenol előállításához használnak. A biszfenol-A termelés gyors emelkedésével a világon előállított mennyisége ma eléri a 2,5 millió tonnát. Polikarbonátokból CD-ROM-ok, ablak- és szemüvegek, elektromos és elektronikai készülékek, szekrények készülnek. (Burridge 2003) Az epoxigyanták enyvek, lakkok, bevonatok alapanyagai. A környezetbe kemény műanyagból készült termékekből, például cumisüvegekből, műanyag edényekből (tányérok, poharak, kancsók), műanyag csomagolóanyagokból, étel- és italtároló dobozokból, flakonokból (műanyag kulacsok, ételhordók),

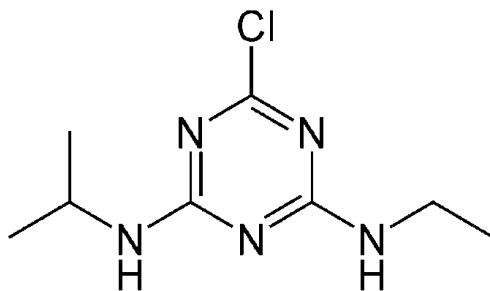
újrátölthető vizes és üdítő palackokból (például kiránduló és sportpalackok), ivóvízvezetékekből, élelmiszeripari csomagolóanyagokból vagy orvosi eszközökből (fogászati anyagok, katéterek, kanülök) kerülhetnek. (CERHR Expert Report for Bisphenol-A 2007) A BPA hő hatására, mechanikai hatásra vagy sav és lúg hatására oldódik. Nagymértékű hasonlóságot mutat az ösztrogén hormonokhoz, ezért a szervezetben megfelelő hormonválaszt indíthat el: szervezetbe kerülve az ösztrogén-receptorokhoz kötődik, és megzavarja a természetes hormonegyensúlyt. S mivel a nemi hormonok sokféleképpen alakítják a folyamatokat a szervezetben, pontos hatások előre szinte megjósolhatatlan.

Emberben férfiaknál csökkentheti a spermiumtermelést, nőknél a saját ösztrogén termelését, meddőséget és idő előtti pubertást okozhat, gyermekkorban pedig befolyásolhatja a másodlagos nemi jellegek kialakulását. A BPA esetleg károsan befolyásolhatja az élő szervezetek idegrendszeri fejlődését. Mivel az agy minden más szervnél érzékenyebb a nemi hormonokra, ezért a BPA befolyással lehet az agy szerkezetére és működésére. A nemi hormonok egyik fontos hatása, hogy az idegsejtek közötti kapcsolatok (szinapszisok) számát szabályozza. A BPA a szinapszisok elpusztításával idegrendszeri rendellenességeket idéz elő. Káros hatással van a szaporító szervekre, növeli egyes ivarszervi tumorok felnőttkori kockázatát, kapcsolatba hozható egyes szív- és érrendszeri betegségekkel, valamint a cukorbetegség magasabb kockázatával. (Internet IV.)

A BPA nagyon kis mennyiségben is káros hatással van az élő szervezetre. Ezen felül sok más ösztrogénszerű hormon-utánzó anyaggal együtt felhalmozódhat az emberi, illetve állati szervezetben, így a kedvezőtlen hatások összeadódnak. A BPA hatása nem egyenes arányban növekszik a koncentráció mértékével. Igen kicsi és a meglehetősen nagy koncentrációkban jóval kifejezettebb, mint a közbülső tartományokba eső mennyiségek. (Haighton 2002)

2.1.1.3 Atrazin

Az atrazin (2-kloro-4-(etilamino)-6-(izopropilamino)-s-triazin) s-triazin hatóanyagot tartalmazó gyomirtószer (peszticid) (4. ábra). Színtelen, nedvesedő por.



3.ábra Az atrazin szerkezeti képlete

(<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/7/7b/Atrazin.png>)

Az atrazin napjaink egyik legvitatottabb gyomirtószere, a fotoszintézis gátlásán keresztül elsősorban magról kelő kétszikű gyomok ellen hatásos. Évtizedek óta használják világszerte a kukoricaveteményekben, a cirok- és cukornádtermesztésben és golfpályák gypén a gyomnövények visszaszorítására. Annak ellenére, hogy betiltották az Európai Unióban még mindig a legszélesebb körben használt gyomirtószerek egyike a világon. (Ackerman 2007) Általában a mezőgazdasági eredetű szennyezések önmagukban nem okoznának kiugróan magas környezeti értékeket. Az atrazin lebomlása azonban csak nagyon lassan megy végbe (perzisztens), felezési ideje 13 és 261 nap között van, ezért az élőlények szervezetében felhalmozódva (bioakkumuláció) mennyisége a környezetben folyamatosan nő. Hosszabb távon az élővilág veszélyeztetése mellett az ivóvízbázisokat is veszélyezteti.

Egyes baktériumok talajból történő kinyerésével és kontrollált körülmények között történő fenntartásával az atrazin és más triazin típusú vegyületek környezetre ártalmatlan termékekké, széndioxiddá és anorganikus nitrogénvegyületekké alakíthatók át.

Az atrazin bár közvetlenül nem képes az ösztrogén receptorhoz kötődni, mégis az ösztrogén hatású vegyületek közé tartozik. A hatás feltételezhetően az aromataznak (cyp 19a) köszönhető, amely a szervezetben a tesztoszteron-ösztrogén egyensúlyt szabályozza, de képes az atrazint ösztrogén receptorhoz köthető molekulává alakítani. Számos halakon, kétélűeken és emlősökön végzett vizsgálat kimutatta, hogy az atrazin káros hatással van a normál endokrin és neuroendokrin, valamint az immunrendszerre. Kétélűekben rövid távú (48 órás), kis koncentrációban alkalmazott (0,1-25 mg/l) atrazin kezelés is jelentősen növelte az „interszex” egyedek kialakulási valószínűségét (Hayes et al. 2002, Hayes et al. 2003), valamint gátolta az ivarszervek fejlődését (Tavera-Mendoza et al. 2002). Az atrazin tesztoszteron szintet csökkentő és ivarszervek fejlődését befolyásoló hatását halakon (Moore et al 1998), aligátorban (Crain et al. 1997) és patkányokban (Friedman et al. 2002) is kimutatták. Bizonyos tanulmányok szerint az atrazin tesztoszteron szintcsökkentő hatása testsúly- és étvágycsökkentő hatásából adódhat, mivel hímekben és nőstényekben egyaránt beleavatkozik a neuroendokrin rendszer jelátviteli folyamataiba. (Eldridge et al. 1999) Mások szerint a testsúlytól és hormonszinttől függetlenül az atrazin gátolta az emlőmirigy fejlődését. (Rayner et al. 2004)

2.2 Toxikus anyagok vizsgálata

A toxikológia egy vegyszer, fizikai vagy kémiai ágens élő szervezetre és az élővilágra gyakorolt káros hatásainak tanulmányozása. Azon a már a 16. században is ismert elven alapul, miszerint egy bizonyos mennyiség fölött bármilyen anyag lehet mérgező.

Napjainkban főként a fejlődő országokban már törvények és rendeletek szabályozzák a gyógyszerhatóanyagok, vakcinák, élelmiszer adalékok, növényvédőszer, ipari melléktermékek és

más potenciálisan veszélyes anyagok termelését és kibocsátását. Ezek a szabályozások előírják az adott anyag toxikológiai vizsgálatát egy meghatározott rendszerben, amelynek eredményei alapján megállapítják, hogy az anyag ipar, mezőgazdaság vagy háztartások szempontjából előnyös sajátságait felülmúlják-e annak a környezetre vagy az emberre gyakorolt káros hatásai.

A kockázatbecslési folyamat három fő fázisra bontható:

- Veszélyességi vizsgálat: Toxikológiai vizsgálatok segítségével felméri az anyag által hordozott potenciális veszélyt (pusztulás, irritáció, fejlődési rendellenességek, rákkeltő hatás stb. felmérése). Az eredmények alapján vizsgálják a hatások (ha van) és az alkalmazott koncentrációk és kitettség összefüggését (dózis-hatás vizsgálat) és meghatározzák azt a legalacsonyabb koncentrációt, amelyben az anyag káros hatást már nem vált ki (NOAEL-no observed adverse effect level).
- Expozíciós (kitettségi) vizsgálat: Az anyagnak már kitett populációk azonosításán és vizsgálatán alapszik, melynek során felméri az expozíció mértékét, időtartamát, típusát, gyakoriságát stb. és az addig jelentkező hatásokat.
- Kockázatjellemezés: Az előző két vizsgálat összetett elemzése során megállapítják az adott anyag által hordozott valós egészségi vagy környezeti kockázatot.

A toxikológiai tesztelés tehát egy meglehetősen összetett folyamat. Az elmúlt évtizedekben ezért számos vizsgálati módszert fejlesztettek ki a minél szélesebb körű tanulmányozás érdekében. A legtöbb módszerhez konszenzus tesztelési protokollokat is kidolgoztak (nemzetközileg érvényes OECD protokollok, az adott országra jellemző szabványok).

Bizonyos tesztelési eljárások az adott anyagra jellemző általános toxikus hatások (akut, szubkrónikus, krónikus), mások a specifikus hatások felmérését célozzák (szaporodási, fejlődési rendellenességek, immunrendszerre gyakorolt hatások, genotoxicitás, karcinogén hatások vizsgálata). Korábban nem vizsgált anyagok esetén elsőként akut toxicitás vizsgálatot végeznek, azaz vizsgálják, hogy az adott anyag rövidtávú kitettség esetén milyen káros hatásokkal rendelkezik és meghatározzák az adott időtartamra jellemző félhalálos dózist vagy koncentrációt (LD_{50} , LC_{50} , half lethal dose/concentration). Ezt követően hosszabb időtartamú, a vizsgált szervezet teljes élettartamánál rövidebb (szubkrónikus) vagy a teljes életsiklust magába foglaló, folyamatos kitettséget modellező (krónikus) kezelések során meghatározzák az adott anyagra jellemző specifikus hatásokat és azok dózisfüggését.

A specifikus hatások tanulmányozására alkalmazható módszerek tárháza széles, a vizuális megfigyeléstől a szövettani vizsgálatokon át a molekuláris biológiai módszerekig számos eszköz áll

a kutatók rendelkezésére. Az, hogy ezek közül melyik megközelítéseket választják, mindig az adott cél alapján dől el. A vizsgálatok során használnak számítógépes becslést (*in silicio* megközelítés), kémiai elemzéseket, sejtvonalakat, azonban ezek nem képesek az élő szervezetben lejárolt komplex folyamatok modellezésére. A toxikológiai tesztelés során tehát mindig szükség van élő szervezetek vizsgálatára is. (Abbott 2005, Monosson 2007)

3.2.1 Modellállatok szerepe a biológiai vizsgálatokban

A biológiai kutatásokban a tudományos módszer- és ennek részeként a modellalkotás- ma általános érvényű. A modellalkotás két alapvető formája az *in vitro* (mesterséges környezetben, szó szerint „üvegben” vagy lombikban) és az *in vivo* „élőben” (vagyis magában az élő szervezetben) kialakított modell. Ezek a modellek tökéletesen alkalmasak számos biológiai kérdés megválaszolására, és értékes adatokat szolgáltathatnak. (Boros 2007)

Az állat modellalkotásnak az állatkísérletekben természetesen számos korlátja van. Talán a legfontosabb, hogy a modellállatokon kapott eredmények nem minden esetben, vagy csak közvetve hasznosíthatók humán körülmények között. Az adatok jelentősége sokszor bizonytalan (kiragadott példa lehet az 50%-os halálos dózis (LC₅₀) eltérő értékei állatokban és emberekben), és a fajok közötti összehasonlíthatóság mindig kérdéses lesz.

Ma minden kutatónak a „3R” alapján, vagyis az állati fájdalom és szenvedés csökkentése, a kísérletekben felhasznált állatok számának csökkentése a lehetőségek határáig és az állati modellek helyettesítése más modellekkel elvei szerint kell megtalálni a legalkalmasabb megoldást, a legjobb modellt. A leghevesebb vita természetesen a helyettesítésről, annak mértékéről és feltételeiről szól. (Boros 2007, Bachmann 2002)

Az ideális modellállatok hasonlóak egymáshoz, méretük szinte egyforma, szaporításuk könnyű, élettartamuk elegendő a vizsgálatok elvégzéséhez, kezelhetőségük egyszerű, tartásuk olcsó, a vizsgálatokat egyszerű rajtuk megismételni. A modellállatoknál alapvető igény, hogy egyértelmű következtetéseket tudjunk levonni, és több paraméter is tanulmányozható legyen az állatokon. (Boros 2007)

Az állatmodellek fő alkalmazási területei:

- Állati viselkedés kutatása (etológiai vizsgálatok)
- Az állatfaj reakcióinak vizsgálata
- Toxicitási vizsgálatok (nem gyógyszerészeti készítmények tesztelése)
- Gyógyszeres tesztek elvégzése
- Kozmetikai tesztek

- Általános orvostudományi vizsgálatok
- Oktatás
- Biológiai kutatások

A modellállatok lehetnek gerinctelen vagy gerinces állatok. A gerinctelenek közé tartoznak az ecetmuslincák (*Drosophila melanogaster*), amelyek a genetika, az élettan, és az evolúcióbiológia klasszikus, máig leggyakoribb modellszervezetei. A leggyakrabban használt a gerinces modellállat az egér, a patkány, a nyúl és a tengerimalac. Egyre gyakoribb a halak modellállatként történő vizsgálata is (pl. zebradánió, paradicsomhal, szivárványos guppi, aranyhal, nílusi tilápia stb.). A toxikológiai vizsgálatokhoz használt modellállatok az általános laboratóriumi gyakorlatban is ismertek, de többségük a fent felsoroltaknál kevésbé népszerű. Víztoxikológiai vizsgálatokhoz leggyakrabban édesvízi gerinctelenek közül ágascsápú rákokat, gerincesek közül a mexikói axolotl, karmosbékát és halakat (zebradánió, medaka, édesvízi gömbhal, szivárványos pisztráng) használnak. (Boros 2007)

2.2.1.1 A zebradánió (*Danio rerio*), mint toxikológiai modell

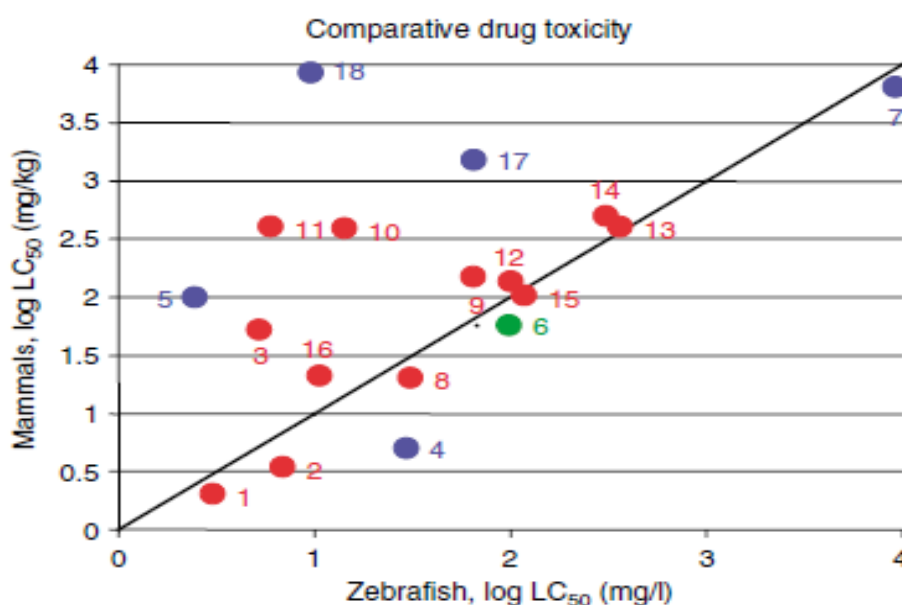
A zebradánió (*Danio rerio*) őshazája Elő-India. Trópusi eredetű házasított halfaj, amely a pontyfélék családjába tartozik. 6 centiméter nagyságúra nő meg és nagyjából 5 évig él. Különböző színű és úszóformájú fajták ismertek, hátuk olajbarnás árnyalatú, az oldalak és a has alapszíne sárgásfehér. (Horn 1983)

A zebradánió (*Danio rerio*) napjainkban az egyik legnépszerűbb modellállat számos tudományterületen (fejlődésbiológia, genetika, toxikológia). Egyre több zebradánióval foglalkozó labor épül a világon, és az ott zajló kutatások nagy eredményekkel rendelkeznek, a kutatók évente több konferenciát is tartanak, számtalan cikk jelenik meg neves szaklapokban, melyekben az elvégzett kutatások eredményeiről tájékoztatnak. A tudomány számára a magyar származású, de az Egyesült Államokban élő Streisinger György fedezte fel ezt a fajt.

A laboratóriumi vizsgálatok és a toxikológiai tesztelés szempontjából számos előnyös tulajdonsággal jellemezhető. Laboratóriumi körülmények között könnyen tartható, kis testű csapathalak. Kis helyigényüknek és méretüknek köszönhetően a vizsgálatok során használt anyag mennyisége (a kis térfogat miatt), a kibocsátott veszélyes hulladék mennyisége és így a vizsgálatok költsége töredékére csökkenthető. Párzás alkalmával a nőstények 20-200 ikrát helyeznek el. Gyorsan fejlődnek, az embrióknak 24 órás korukra az összes létfontosságú szervük kifejlődik, 72 órával a termékenyülés után kikelnek a lárvák, majd ezt követően 2-3 nap alatt elúsznak, és az 5. nap környékén megkezdik önálló táplálkozásukat. 3-4 hónap alatt ivaréretté válnak. A zebradánió

ikrahéj, valamint egy adott fejlődési állapotig a lárva is átlátszó, így az embrió és azon belül az egyes szervek fejlődése mindenféle beavatkozás nélkül mikroszkópos vizsgálatok során jól nyomon követhető. (Hill et al. 2005)

Teljes genomi szekvenciája ismert, az élettani és molekuláris biológiai folyamatok nagymértékű hasonlóságot mutatnak más emlősökkel és az emberrel. Kari és mtsai. (2007) vizsgálatai alapján a zebradánió végzett toxikológiai vizsgálatok eredményei jól korrelálnak a más emlősökön végzett vizsgálatokkal (5. ábra).



5. ábra: A zebradánió embriókon végzett toxicitás vizsgálatok összevetése más emlős modellekkel. Az ábra logaritmikusan ábrázolja a zebradánió (X tengely) és az emlős modelleken (Y tengely) kapott eredmények (LC₅₀ értékek) összefüggését. A zebradánió embriókat 18 anyaggal kezelték: (1) geladanamycin, (2) didemnin B, (3) merbarone, (4) Fujisawa fehérje, (5) tritiofén (6) 4-ipomeanol, (7) etanol, (8) doxorubicin, (9) cetaminophen A, (10) cetamin, (11) cetamino, (12) aszpirin, (13) dexametazon, (14) cetaminophen, (15) koffein, (16) takrin, (17) diklór-ecetsav, (18) poliklórozott bifenilek. A piros, kék és zöld körök az egéren, patkányon és nyúlra kapott eredményeket mutatják.

Fontos kihangsúlyozni a halembriókon történő tesztelések állatvédelmi jelentőségét is. A Német Állatvédelmi Törvényben, mely az EU állatvédelmi törvényén alapul és köztudottan nagyon szigorú, a halembriókon történő kísérletezés nem minősül állatkísérletnek amennyiben az nem táplálkozó lárva előtti stádiumon történik. (Nagel 2002)

2.2.1.2 Transzgenikus zebradánió vonalak

A mai géntechnológia már lehetővé teszi bármely élőlényből származó, esetlegesen mesterségesen is módosított, vagy teljesen szintetikus eredetű DNS szakasz beültetését más élőlények sejtjeibe. Az idegen eredetű DNS a fogadó szervezet genomjába beépül, és ott örökletesen fennmarad. Akkor beszélhetünk transzgenikus élőlényről, ha a beültetett DNS szakasz egy vagy több működőképes gént tartalmaz, vagy folyamatosan megváltoztatja a gazda szervezet bármely génjének működését.

A transzgenikus állatmodellek az elmúlt évtizedben a toxikológiai vizsgálatok hatékony eszközeivé váltak. Segítségükkel lehetőség nyílik egy adott élettani folyamat genetikai hátterének mélyrehatóbb tanulmányozására és az egyes faktorok szerepének megértésére. Alkalmasak mutagén, karcinogén hatások felderítésére és széleskörű vizsgálatára, ezáltal nagy segítséget nyújtanak egy anyag toxikológiai kockázatbecslésében. (Boverhof et al. 2011)

A transzgén technikák fejlődésével, valamint az emlősökön alkalmazható technikák adaptálásával számos a zebradánióra is alkalmazható transzgén eljárást dolgoztak ki. Ennek köszönhetően napjainkban számos mutáns és transzgenikus zebradánió vonal létezik szerte a világon.

A transzgenikus vonalak alkalmazásával a molekuláris háttér felderítése mellett lehetőség nyíllhat bizonyos szervek, szervrendszerek, sejtek fejlődésének behatóbb vizsgálatára. Az adott szer hatására bekövetkező fejlődési rendellenességek detektálására olyan vonalak vizsgálatával, amelyekben a fő toxikológiai célszervek (máj, vese, vérsejtek, érrendszer, idegrendszer) valamelyike fluoreszcens fehérjével jelölt. Mivel a fluoreszcens jel jól láthatóvá teszi a célszervet, a kialakuló rendellenességek in vivo tanulmányozhatóak az állat feláldozása nélkül.

Kísérleteink során egy vérsejt (gata-1: DsRed, Long et al. 1997) és egy vérér (fli-1: EGFP, Lawson és Weinstein 2002) transzgenikus zebradánió vonalat vizsgáltunk.

A GATA-1 (globin transcription factor-1) fehérje az erithroid sejtek, eozinofil granulociták és hízósejtek fejlődéséhez (terminális differenciációjához) elengedhetetlenül szükséges transzkripciós faktor. Kulcsfontosságú szerepe miatt a különböző fejlődési stádiumokban a vérsejtképzésben résztvevő szervek azonosításának egyik legfontosabb eszköze. A transzgenikus vonalat olyan konstrukcióval hozták létre, amelyben a GATA-1 transzkripciós faktor promóter régióját vörös fluoreszcens fehérjét (DsRed) kódoló gén elé építették. A transzgenikus vonal segítségével jól vizsgálható a különböző anyagok vérképző szervekre és vérsejtekre gyakorolt hatása. Mivel zebradánióban embrionális korban a szív, felnőtt korban a vese egy részében képződnek az erithroid sejtek, ezért a vonal segítségével az ezekben a szervekben bekövetkező elváltozások is megfigyelhetők. (Long et al. 1997)

A Fli-1 (Friend leukemia integration site-1) a hemopoetikus (vérképző) szövetekben (embrionális korban ICM) és szervekben (vese, csecsemőmirigy, szív) és az endoteliális sejtekben (érfal) magas expressziós szintet mutató transzkripciós faktor. A transzgenikus vonalat olyan génkonstrukció segítségével hozták létre, amelyben a zöld fluoreszcens fehérjét kódoló gént (GFP) a Fli-1 gén transzkripciós start helye elé építették. (Lawson és Weinstein 2002)

3. Anyag és módszer

3.1 Felhasznált állatok

Munkánk során vérér és ér transzgenikus vonalakat használtunk. A halakat a Szent István Egyetem Halgazdálkodási Tanszékének Tecniplast zebradániós haltartó rendszerében tartottuk ivar szerint szétválogatva. Egy 3 literes medencében 15 egyed került elhelyezésre. A halakat 25,5°C-on, állandó vízminőségi paraméterek mellett, 14/10 órás sötét/világos ciklusban tartottuk. A halak etetése száraz haltáppal történt (SDS), amelyet hetente két alkalommal frissen kikelt sórák lárvákkal (*Artemia salina*) egészítettünk ki.

3.2 Zebradánió embriók nyerése

A kísérletek megkezdése előtti napon a zebradánió szülőpárokat szaporító edényekbe helyeztük, a párok itt töltötték az éjszakát egymástól elválasztva. A szoba és ezáltal a víz hőmérsékletét 27 °C-ra emeltük. Másnap reggel került sor a hímek és nőstények összeengedésére, ezután történt meg az ívás. A szülők eltávolítása után az ikrákat 10 cm-es Petri-csészékbe helyeztük át, innen történt átválogatásuk a termékenyülés ellenőrzése után az 5 cm-es Petri-csészékbe.

3.3 Zebradánió embriók kezelése ösztrogén hatású anyagokkal

A kezelések megkezdése előtt az 5 cm-es Petri-csészékbe a termékenyülés napján (0 dpf = 0 days post fertilization) 25 db termékenyült ikraszemet helyeztünk ki, mindegyik koncentrációból 2 párhuzamost (2db Petri-csészét) állítottunk be. Miután az ikrákat leszámoltuk és a Petri-csészéket feliratoztuk, minden csészét feltöltöttünk a megfelelő koncentrációjú oldattal. Ezt követően a Petri-csészéket 27,5 °C hőmérsékletű inkubátorba helyeztük.

3.3.1 Ösztrogén (17- β -ösztradiol)

Az első kezelést ösztrogénnel (17- β -ösztradiol) végeztük 6 koncentrációban. Ezek a következők: 200 ng/l, 100 ng/l, 50 ng/l, 25 ng/l, 12,5 ng/l, 6,25 ng/l. Első lépésben 1 mg/l-es törzsoldatot készítettünk (1 μ l 1 g/l 17- β -ösztradiol + 999 μ l etil-alkohol). Ezt követően elkészítettük a 200ng/l-es oldatot, és ebből hígítottuk ki a többi koncentrációt, majd a Petri-csészékbe 15ml megfelelő koncentrációjú oldatot mértünk. Negatív kontrollként rendszervizet (a zebradániós haltartó rendszer vizét) és oldószeres kontrollt (a legnagyobb koncentrációjú ösztrogén oldattal megegyező koncentrációban: 1 % etil-alkohol) használtunk.

3.3.2 Atrazin

Az atrazinos kezelésnél három koncentrációt alkalmaztunk: 20 mg/l, 10 mg/l, 5 mg/l. Minden koncentrációnál két párhuzamos kezelést végeztünk. Először elkészítettük a 15 g/l-es törzsoldatot (15 mg atrazin 1 ml acetonban oldva), majd a 20 mg/l-es koncentrációt, amelyből kihígítottuk a másik két koncentrációt. A Petri-csészékbe belemértünk 15-15 ml megfelelő koncentrációjú oldatot. Negatív kontrollként ennél a kezelésnél is rendszervizes és oldószeres (1,33 % aceton) kontrollt használtunk.

3.3.3 Biszfenol-A

A biszfenol-A esetében az ösztrogénhez hasonlóan 6 féle koncentrációt határoztunk meg (100 mg/l, 50 mg/l, 25 mg/l, 12,5 mg/l, 6,25 mg/l, 3,125 mg/l). A kezelés befejeztével a töményebb koncentrációkban sok elhullást tapasztaltunk, ezért a legkisebb koncentráció alatt meghatároztunk további négy koncentrációt (1,55 mg/l, 0,75 mg/l, 0,375 mg/l, 0,165 mg/l) és ezekkel megismételtük a kezelést. Mindkét kezelésnél először elkészítettünk 1 g/l-es törzsoldatot 1% dimetil-szulfoxidban (DMSO). Mindkét kezelésnél először a legtöményebb koncentrációt készítettük el, majd ebből hígítottuk ki a sor többi tagját. Mindkét kezelésnél rendszervizes és oldószeres (0,1 % DMSO) kontrollt használtunk.

3.4 Mikroszkópos vizsgálatok

Az embriókat 3 napos korig (3 dpf) tartottuk a kezelőoldatokban. A kezelés megkezdését követő első és második napon fénymikroszkóp (Olympus) alatt vizsgáltuk a fejlődési rendellenességeket, torzulásokat, valamint meghatároztuk az elpusztult és életben maradt embriók számát. Előbbieket eltávolítottuk a Petri-csészékből. Az eredményeket táblázatban rögzítettük.

A fénymikroszkópos vizsgálatokat a harmadik napon is elvégeztük, valamint fluoreszcens mikroszkóp (Leica M205 FA) (6. ábra) alatt a vér- és érrendszerben megfigyelhető elváltozásokat is detektáltuk és ezeket a mikroszkóphoz tartozó szoftver segítségével (LAS) fényképen is rögzítettük.



6. ábra: A fluoreszcens mikroszkóp (Leica M205 FA)

Minden esetben rögzítettünk egy teljes testet mutató felvételt (40x nagyítás), majd nagyobb nagyításon (100x) külön a fejet, a test középső részét valamint a farki részt is lefotóztuk. A megfelelő fluorszcens szűrőt (a vörös fluoreszcens fehérjéhez RFP, a zöld fluoreszcens fehérjéhez GFP) használva az exponálási időt a fluoreszcens jel erőssége alapján állítottuk be. A teljes test esetén mindig alacsonyabb, a testről készült felvételek esetén mindig magasabb exponálási idővel dolgoztunk.

A fényképek kiértékelése vizuális alapon történt. A kiértékelés során az eredményekhez elegendő a fejről és a farki részről készült fényképek értékelése, mivel a teljes test és a test középső részéről készült felvételeken ugyanazok a rendellenességeket láthatóak.

4. Eredmények és értékelés

Kísérleteink során három ösztrogén hatású anyag, az ösztrogén (17- β -ösztradiol), az atrazin és a biszfénol-A fejlődésre, pigmentáltságra és a kardiovaszkuláris rendszerre gyakorolt hatásait vizsgáltuk transzgenikus (vér és érrendszer) zebradánió vonalon. A vizsgálatok előkísérletként szolgálnak egy többszínű, ösztrogén hatású anyagok vizsgálatára alkalmas transzgenikus zebradánió vonal létrehozásához. Hogy felmérjük, a vizsgált vonalak valóban alkalmasak-e olyan fejlődési rendellenességek detektálására, amelyeket a normál, fénymikroszkópos vizsgálatok nem tesznek lehetővé, a környezetben előforduló koncentrációknál nagyobb, az irodalmi adatok alapján biztosan élettani hatást kiváltó koncentrációkat használtunk.

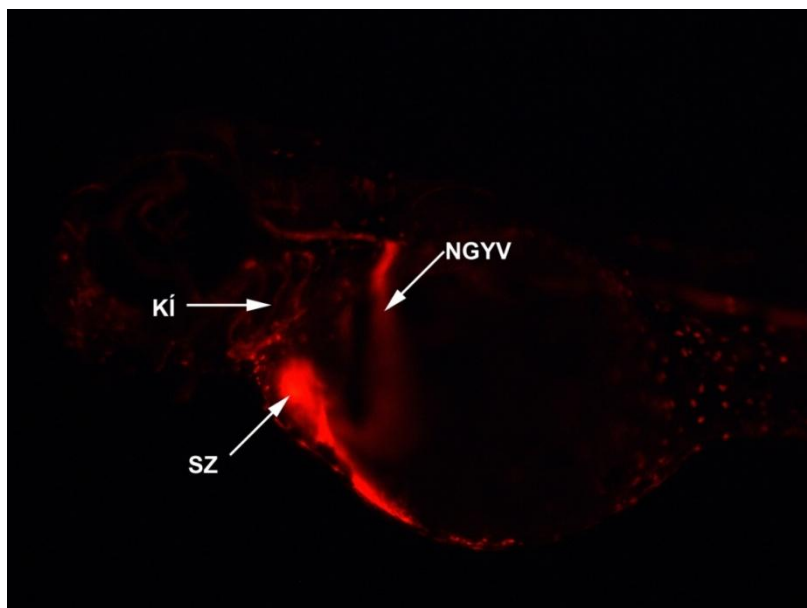
Kontrollként minden esetben a zebradániós haltartó rendszer vizét és az anyag legnagyobb koncentrációjának megfelelő oldószeres kontrollt használtunk. Mivel az oldószeres kontrollok a rendszervizes kontrolltól jelentősen nem tértek el, ezeket egy fejezetben tárgyaljuk.

4.1 Kontroll egyedek



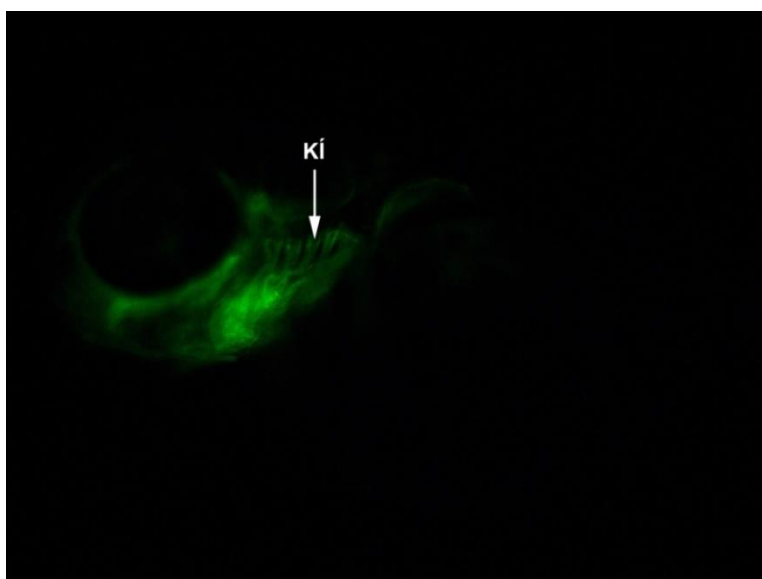
7. ábra: Kontroll egyedről készült normál megvilágítású felvétel (40x-es nagyítás)

Az 7. ábrán egy kontroll 3 napos transzgenikus zebradánió embrióról készült kép látható (normál megvilágítás). Az egyed a korának megfelelően fejlett, torzulások nem láthatóak a testen. A test és a szem normál pigmentáltságú, a törzs egyenes. Ödéma sem a szíken, sem a szívburkon nem figyelhető meg. A szelvényhatárok jól elkülöníthetők.



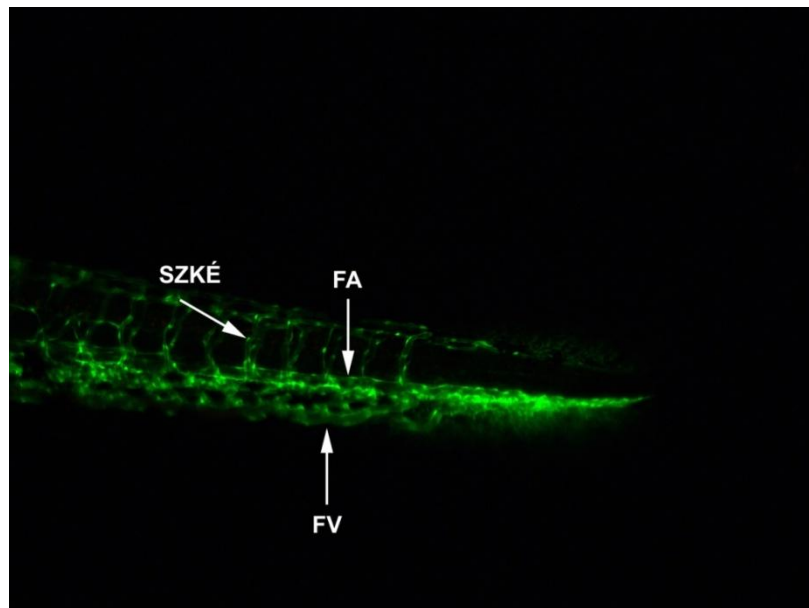
8. ábra: Kezeletlen, vérsajt tarszgenikus embrió fejéről készült fluoreszcens kép (RFP szűrő, 100X) (Rövidítések: SZ: szív, KÍ: kopoltyúív, NGYV: nagy gyűjtővéna)

Az 8. ábrán egy kontroll GATA-FLI transzgenikus zebradánió embrió feji részéről készült fluoreszcens mikroszkópos felvétel látható (RFP szűrő). A képen jól látszik, hogy a vörösvérsejtek nagy része már az erekben áramlik, a szik és sziktömlő felszínén csak elszórtan találhatóak meg. Vérömlenyek nem láthatóak a feji részen. A szív és a szívburók normálméretű. A nagy gyűjtővénában és a kopoltyúívekben található erekben is szépen áramlik a vér, zártak, nincsenek bennük sem elzáródások sem tágulatok.



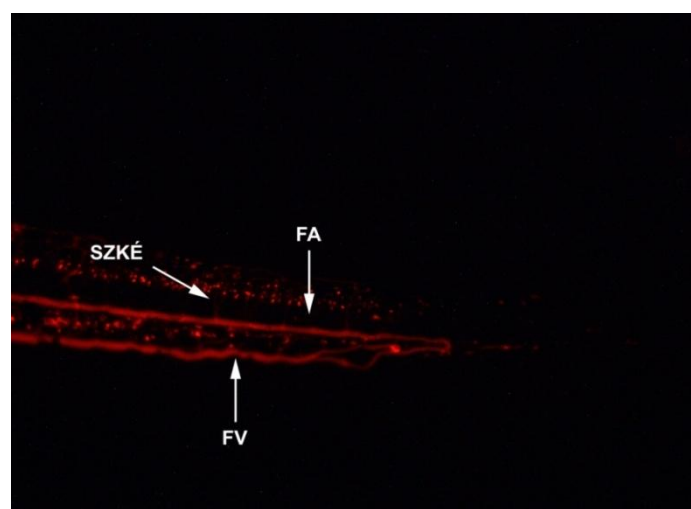
9. ábra: Normál tarszgenikus embrió fejéről készült fluoreszcens kép (GFP szűrő, 100X) (Rövidítés: KI: kopoltyúív)

Az 9. ábrán ugyanazon embrió feji részéről készült fluoreszcens mikroszkópos felvétel látható (GFP szűrő). Jól megfigyelhetők a kopolyúívek erei, melyek az embrió korának megfelelően fejlődtek, rajtuk sem elhalás, sem torzulás nem figyelhető meg.



10. ábra Normál tarszgenikus embrió farkáról készült fluoreszcens kép (GFP szűrő, 100X) (Rövidítések: SZKÉ: szelvények közötti ér, FA: fark artéria, FV: fark véna)

A kontroll embrió farkrészéről készült felvételen (10. ábra) megfigyelhető, hogy a szelvények közötti erek szépen formáltak, jól követik a szomiták határait, sem kóros tárgulatok sem szűkületek nem figyelhetők meg rajtuk. A fark artéria és a fark véna az embrió fejlődési állapotnak megfelelő fejlettségű és jól elkülöníthető egymástól.



11. ábra: Normál transzgenikus embrió farkáról készült fluoreszcens kép (RFP szűrő, 100X) (Rövidítések: SZKÉ: szelvények közötti ér, FA: fark artéria, FV: fark véna)

Az 11. ábrán jól látszik, hogy a kontroll egyed ereiben a vér akadálytalanul tud áramlani. A fark véna és a fark artéria jól elkülöníthetők egymástól.

4.2 Ösztrogén kezelés eredményei

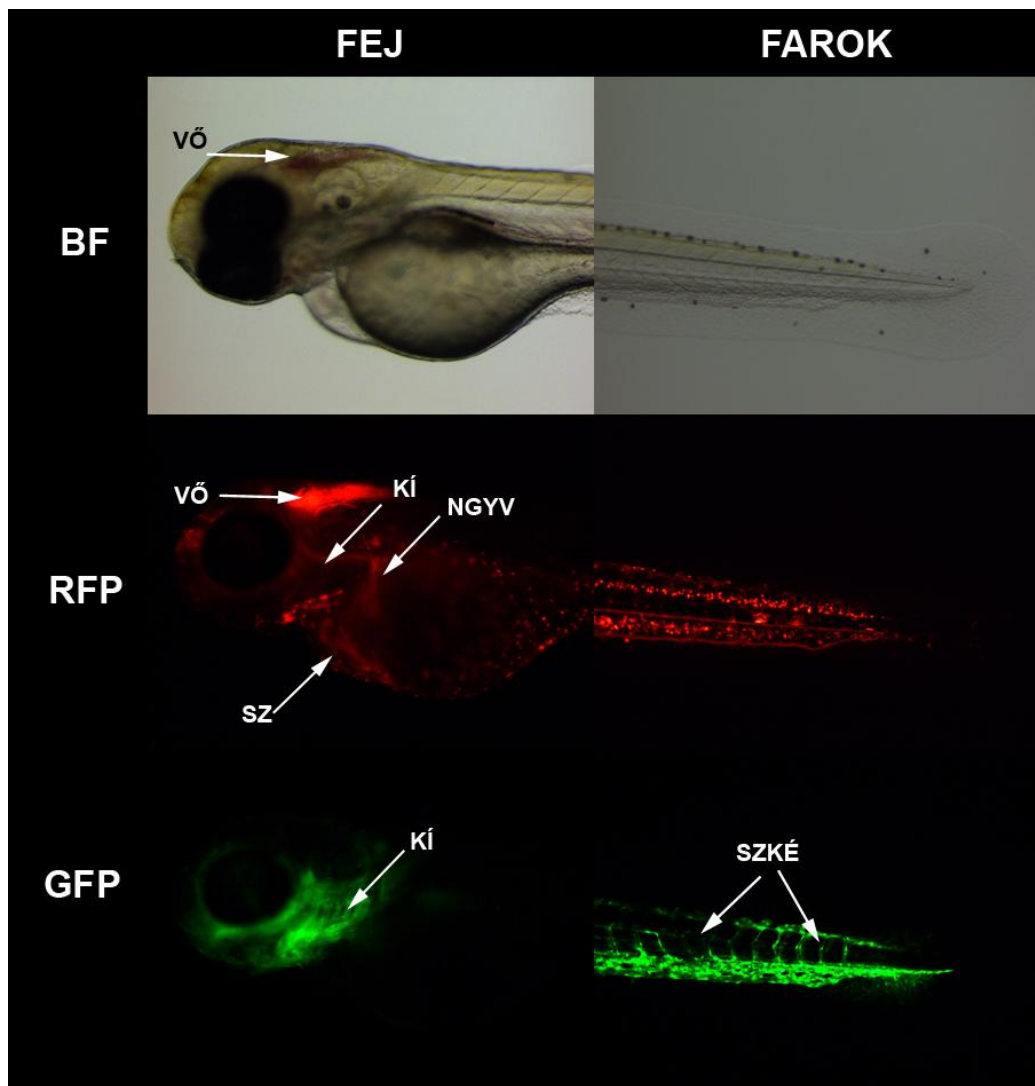
A kísérletben 6 ösztrogénkoncentrációt állítottunk be, a normál (vizes kontroll) és oldószeres kontroll (alkoholos kontroll) mellett (1. táblázat). A koncentrációk kiválasztásánál az irodalmi adatokban szereplő már biztosan élettani elváltozásokat okozó koncentráció mellett (100 ng/l) a környezetben is előforduló mért mennyiséget (6,25 ng/l) vettük alapul.

Koncentrációk	Elpusztult*	Kelések*	Szik- vagy perik. ödéma*	Egyéb*
vizes kontroll	12%	100%	0%	0%
alkoholos kontroll	10%	96%	0%	0%
200 ng/l	32%	82%	5,8%	8,8%
100 ng/l	28%	69,4%	0%	8,3%
50 ng/l	32%	91%	5,8%	0%
25 ng/l	46%	77,7%	0%	3,7%
12,5 ng/l	34%	100%	0%	9%
6,25 ng/l	36%	96,8%	0%	6,5%

1. táblázat: Az ösztrogénkezelés eredményeinek összefoglaló táblázata.

*: A kísérlet végéig életben maradt egyedek arányában

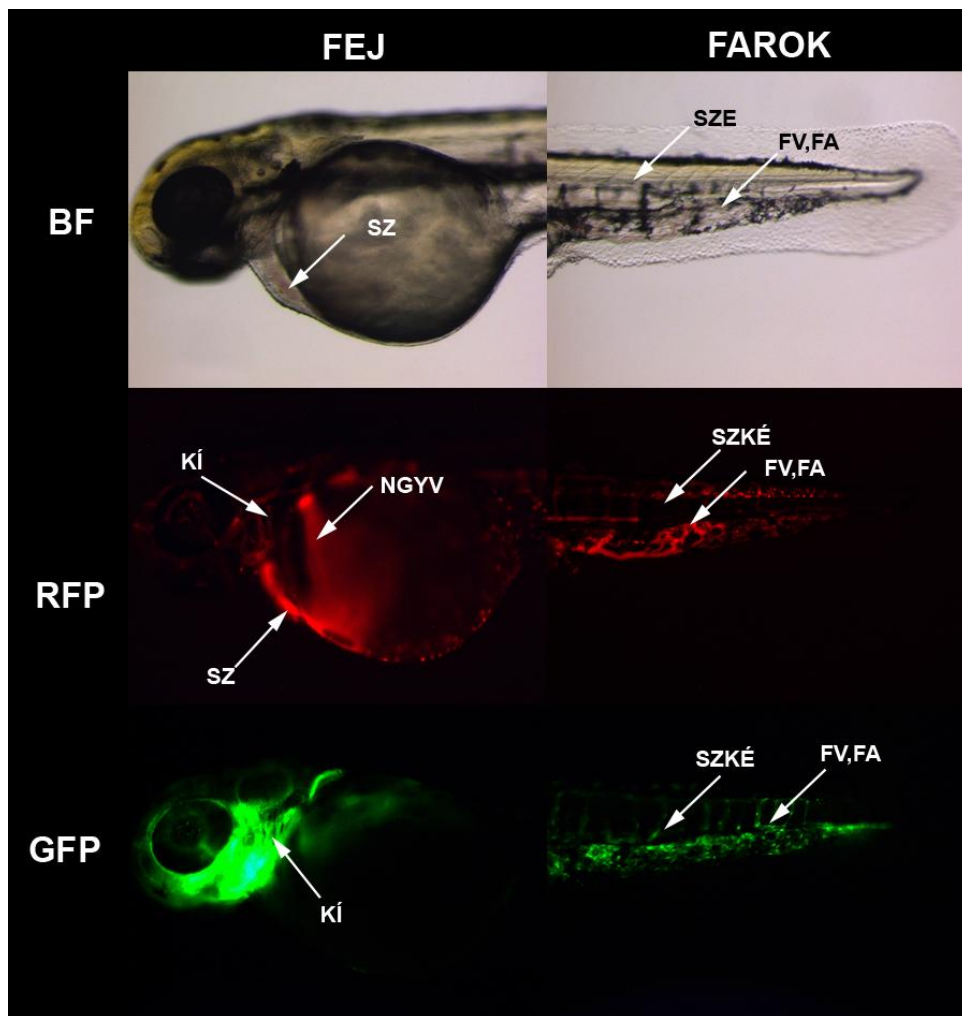
A kapott eredmények alapján elmondható, hogy az ösztrogénnek, a vizsgált koncentrációkban, több negatív hatása is volt az embriókra. Már igen alacsony koncentrációban is megemelte az elpusztult egyedek arányát a kontrollokhoz képest. Hatása volt a kelési időre, valamint az egyedek pigmentáltságára és a vér és érrendszeri fejlődésére. A főbb fenotípusos elváltozásokat a következő ábrákon mutatjuk be:



12. ábra: Ösztrogén kezelés hatására bekövetkező fenotípusos elváltozások I.

(Rövidítések jegyzéke: VŐ: vérömleny SZKÉ: szelvények közötti ér: SZ: szív,
KÍ: kopolytűív, NGYV: nagy gyűjtővéna)

Az ösztrogénkezelések egyik legszembetűnőbb hatása a pigmentáltság csökkenése (fénymikroszkópos felvételek), valamint elsősorban a feji részen, a különböző vérömlenyek megjelenése volt az egyedek egy részében (RFP felvételek, 12. ábra). Megfigyelhető volt továbbá, hogy a vörösvérsejtek jó része a testben elszórtan helyezkedett el és nem az erekben mozgott.



13. ábra: Ösztrogén kezelés hatására bekövetkező fenotípusos elváltozások II.

(FA: farok artéria, FV: farok véna, SZKÉ: szelvények közötti ér, SZ: szív,

KÍ: kopoltyúív, NGYV: nagy gyűjtővéna)

Megfigyelhető volt továbbá, hogy néhány egyednél a szelvényezettség és az érrendszer kialakulásában is jelentős zavarokat okozott az anyag. Az 13. ábrán az embrió farkáról készült képen jól látszik, hogy a szelvényhatárok nem párhuzamosan futnak egymással, illetve a szelvények alakja nem a normál „V” mintázatot adja (U shape). Több egyeden észleltük a farkrész torzulását is. A szelvények torzult lefutását jól követik a szelvények közötti erek is (RFP, GFP felvételek). A fluoreszcens felvételek további vizsgálatából az is megállapítható, hogy egyes erek kialakulása nem (SZKÉ) vagy csak részlegesen, illetve torzan ment végbe (NGYV, FV, FA), több helyen láthatóak rajtuk elzáródások, illetve kiöblösödések. A vér keringését biztosító szív is fejletlen volt az egyedek egy részénél.

4.3 Atrazin kezelés eredményei

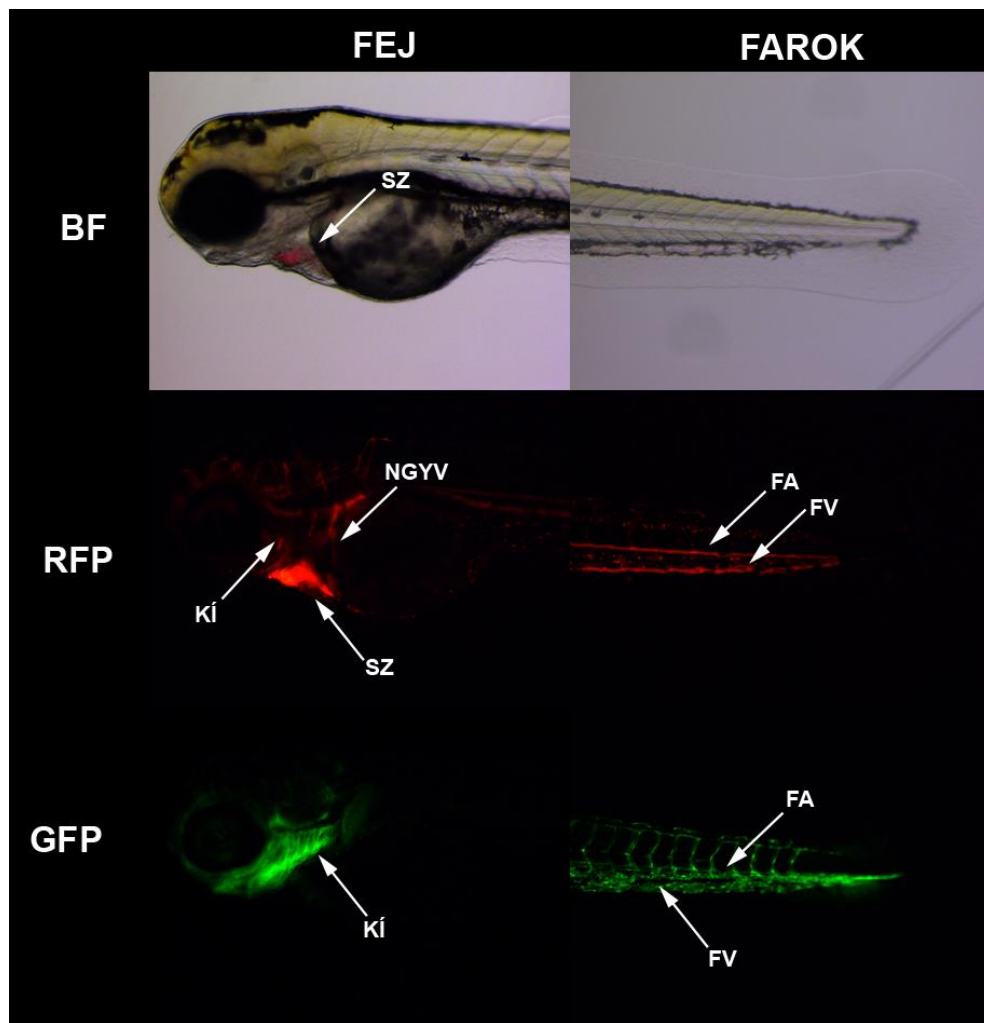
A kísérletben 3 atrazin koncentrációt vizsgáltunk, a normál (vizes kontroll) és oldószeres kontroll (acetonos kontroll) mellett (2. táblázat). A kísérletben csak olyan koncentrációkat használtunk, amelyek már biztosan okoznak élettani rendellenességeket.

Koncentrációk	Elpusztult*	Kelések*	Szik- vagy perik. ödéma*	Egyéb*
vizes kontroll	12%	100%	0%	0%
acetonos kontroll	6,6%	50%	0%	7,1%
20 mg/l	23,3%	17,4%	0%	17,4%
10 mg/l	16,6%	28%	8%	12%
5 mg/l	23,3%	52%	0%	13%

2. táblázat: Az atrazin kezelés eredményeinek összefoglaló táblázata.

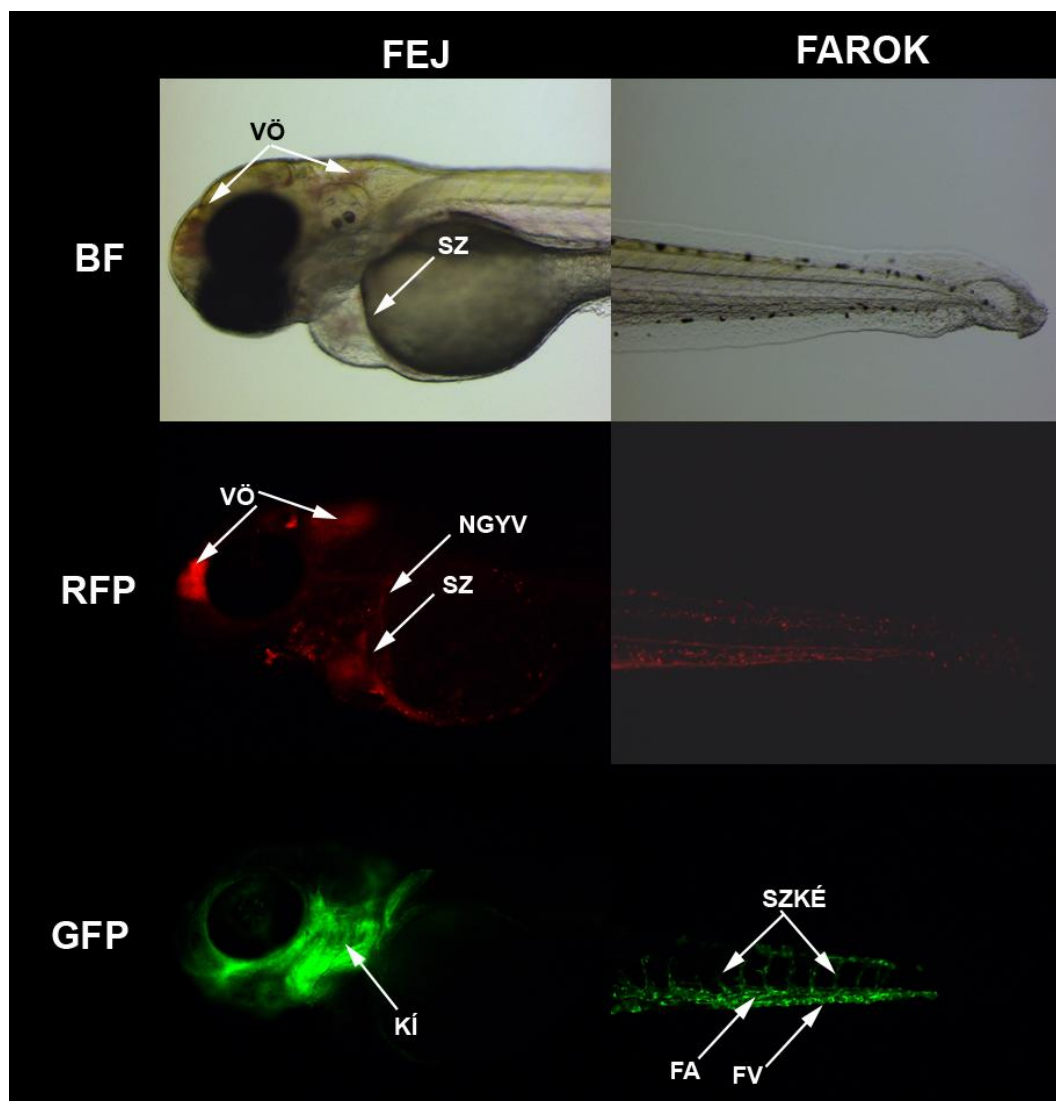
*: A kísérlet végéig életben maradt egyedek arányában

A kapott eredmények alapján elmondható, hogy az atrazinnak, a vizsgált koncentrációkban, több negatív hatása is volt az embriókra. Már az alacsony koncentrációban is megemelte az elpusztult egyedek arányát a kontrollokhoz képest. Hatása volt a kelési időre valamint az egyedek pigmentáltságára, a vér és érrendszeri fejlődésére, valamint több esetben fark torzulást idézett elő. A főbb fenotípusos elváltozásokat a következő ábrákon mutatjuk be:



14. ábra: Atrazin kezelés hatására bekövetkező fenotípusos elváltozások I.
 (FA: farok artéria, FV: farok véna, SZKÉ: szelvények közötti ér, SZ: szív,
 KÍ: kopolyúív, NGYV: nagy gyűjtővéna)

Alacsony koncentrációval kezelt egyedeken több esetben is megfigyeltük a csökkent pigment termelést az egyedek egész testfelületén (BF képek), illetve a szív fejletlensége is több esetben előfordult. Annak ellenére, hogy az erek viszonylag jól fejlettek voltak az alacsony dózisú kezelés mellett, a nem megfelelő szívműködés miatt a vér csak gyengén áramlott az embriók szervezetében. (14. ábra)



15. ábra: Atrazin kezelés hatására bekövetkező fenotípusos elváltozások II
 (FA: farok artéria, FV: farok véna, SZKÉ: szelvények közötti ér, SZ: szív,
 KÍ: kopolyúív, NGYV: nagy gyűjtővéna)

A magasabb atrazin-koncentrációval kezelt embriókon nagy számban fordultak elő a különböző nagyságú vérömlenyek, elsősorban a feji részen. A vérömlenyek nagysága és száma meghaladta az ösztrogénkezelés során tapasztaltakat, a vérsejtek jelentős része az ereken kívül helyezkedett el. A 20mg/l-es kezelésben a farok artéria és a farok véna fejletlensége, illetve a szelvényközi erek részleges hiánya is jellemző fenotípusos elváltozás volt (15. ábra). Az atrazin hatására a túlélő egyedek közel negyede mutatott valamilyen torzulásos rendellenességet a faroktájékon, illetve szinte minden esetben megfigyelhető volt a csökkent pigmenttermelés is. Néhány esetben kezdődő perikardiális ödémát is megfigyeltünk.

4.4 Biszfenol-a kezelés eredményei

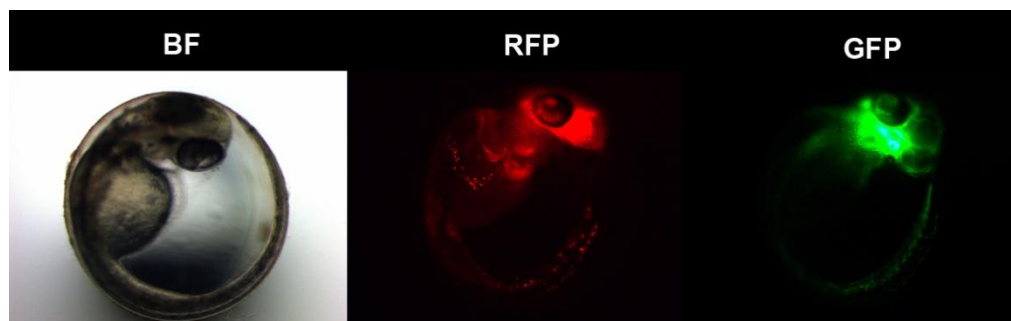
A kísérletben 10 Biszfenol-A koncentrációt állítottunk be, a normál (vizes kontroll) és oldószeres kontroll (DMSO kontroll) mellett (3. táblázat). A koncentrációk kiválasztásánál az irodalmi adatokban szereplő már biztosan élettani, növekedési rendellenességeket okozó koncentrációkat vettük alapul, illetve ezeket jelentősen meghaladó mennyiségeket is használtunk.

Koncentrációk	Elpusztult*	Kelések*	Szik- vagy perik. ödéma*	Egyéb*
vizes kontroll	12%	100%	0%	0%
DMSO kontroll	14%	97,7%	0%	2,3%
100 mg/l	100%	0%	0%	0%
50 mg/l	100%	0%	0%	0%
25 mg/l	100%	0%	0%	0%
12,5 mg/l	68%	0%	0%	0%
6,25 mg/l	18%	48,7%	0%	0%
3,125 mg/l	8,8%	80%	0%	0%
1,55 mg/l	20%	42,5%	17,5%	5%
0,75 mg/l	42%	86%	3,4%	6,9%
0,375 mg/l	26%	48,6%	16%	5,4%
0,165 mg/l	32%	70,6%	5,8%	14,7%

3. táblázat: A biszfenol-A eredményeinek összefoglaló táblázata.

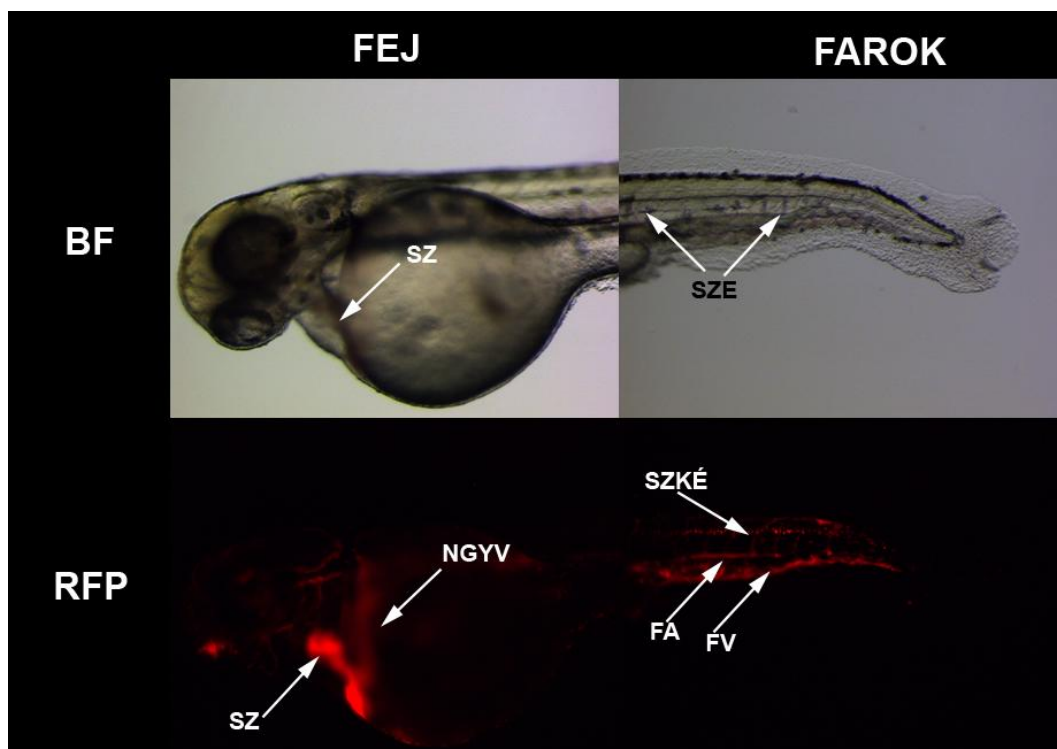
*: A kísérlet végéig életben maradt egyedek arányában

A kapott eredmények alapján elmondható, hogy a biszfenol-A-nak a vizsgált koncentrációk mindegyikében több negatív hatása is volt az embriókra. Már igen alacsony koncentrációban is megemelte az elpusztult egyedek számát a kontrollokhoz képest. Jelentős hatása volt a kelési időre, minden koncentrációban meghosszabbította a keléshez szükséges időt (16. ábra), valamint csökkentette az egyedek pigmentáltságát és negatív hatása volt a vér és érrendszeri fejlődésére is. A főbb fenotípusos elváltozásokat a következő ábrákon mutatjuk be:



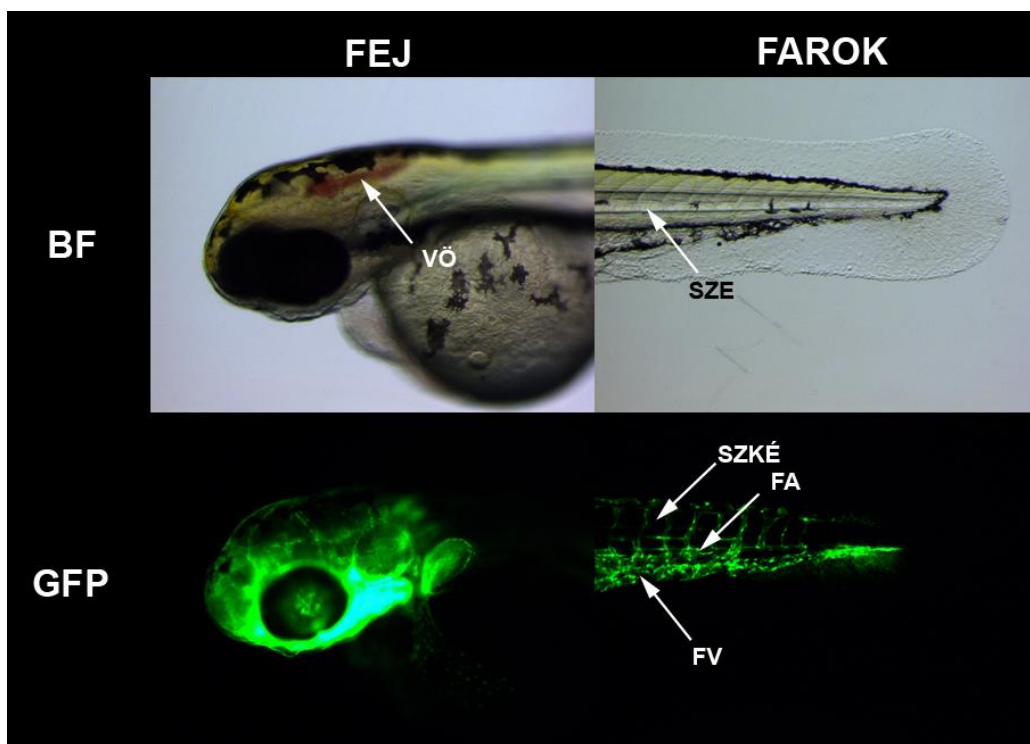
16. ábra: Biszfenol-A hatására bekövetkező fenotípusos elváltozások I.

A képeken 72 óráig még ikrahéjban lévő embriók láthatók.



17. ábra: Biszfenol-A hatására bekövetkező fenotípusos elváltozások II. (FA: farok artéria, FV: farok véna, SZKÉ: szelvények közötti ér, SZ: szív, KÍ: kopoltyúív, NGYV: nagy gyűjtővéna)

A biszfenol-A egyik legszembevetőbb hatása a farok torzulása illetve az úszókezdemenyek deformáltsága volt, melyek már az alacsony koncentrációkkal történő kezelésekkor is megnyilvánultak (17. ábra). A torzult farokrészben az erek torzulása is megfigyelhető volt, a farok artéria és a farok véna azonban jól elkülöníthető volt egymástól, kóros szűkületek nem, tágulatok viszont megfigyelhetőek bennük. A szív mérete több esetben is kisebb volt a normál egyedek szív méreténél.



18. ábra: Biszfenol-A hatására bekövetkező fenotípusos elváltozások III.
 (FA: farok artéria, FV: farok véna, SZKÉ: szelvények közötti ér, SZ: szív,
 KÍ: kopoltyúív, NGYV: nagy gyűjtővéna)

Az egyedek egy részénél, a másik két anyaghoz hasonlóan, megjelentek a vérömlenyek az embriók feji részén. A fénymikroszkópos felvételen jól látszik, hogy a farkrészben található szelvények morfológiája eltér a normál fejlődésűtől, a szomiták U alakúak (U shape). A szelvény közötti erek lefutása követi a szelvényhatárokat, így alakjuk szintén eltér a normálistól. (18. ábra)

4.5 Következtetések és javaslatok

A vizsgált anyagok mindegyike okozott fejlődésbeli rendellenességet a vizsgált vonalakon. Minden esetben megfigyelhettünk a pigmentáltságra és a vér- és érrendszerre kifejtett káros hatást is. Ez utóbbiak jó része normál, fénymikroszkópos vizsgálatokkal nem figyelhető meg. A vizsgálatok eredményei alapján tehát a vonalak valóban felhasználhatóak lesznek a tervezett többszínű vonal létrehozásához, valamint más anyagok teszteléséhez, azonban további, a környezetben előforduló koncentrációk vizsgálata javasolt.

Megfontolandó lehet a transzgenikus vonalak alkalmazása és beépítése a toxikológiai vizsgálatok során eddig használt OECD protokollokba is. A vizsgálatok jól megfelelnek a „3R stratégiának”, mivel a kísérleti állatok feláldozása nélkül, ugyanazon állatban különböző időpontokban van lehetőség olyan rendellenességek kimutatására, amelyekre korábban csak invazív

eljárásokkal vagy az embrió fixálását követő festési eljárások alkalmazásával volt lehetőség. Emellett a szív működés mélyrehatóbb tanulmányozását is lehetővé teszi, valamint a vérkeringésbeli eltérések jobb megfigyelését biztosítja.

5. Összefoglalás

Az ipar és a mezőgazdaság fejlődésével egyre többféle vegyi anyag jut a környezetbe, amelyek között számos nagy mennyiségben kijutó, a hormonháztartást megzavaró ösztrogénhatású anyag is található. A kikerülő szennyezőanyagok veszélyeztetik az érintkező élő szervezeteket, ezért kimutatásuk és hatásuk vizsgálata nagy jelentőséggel bír.

A vér és érrendszer a legfontosabb toxikológiai célszervek közé tartoznak, mélyrehatóbb morfológiai vizsgálatuk csaknem minden esetben (kivéve vérvétel) a kísérleti állatok feláldozásával jár. A laboratóriumi állatokon végzett kísérletek tervezésekor azonban egyre inkább követelmény a vizsgálatok helyettesítése, csökkentése és finomítása (3R stratégia).

A zebradánió (*Danio rerio*) évtizedek óta az egyik legáltalánosabban használt laboratóriumi modellállat. Embrióit és lárváit a táplálkozó kor eléréséig az Európai Unióban hatályos állatvédelmi szabályok nem tekintik élő állatnak. Mivel ebben a stádiumban a lárvák még átlátszóak, a fluoreszcens fehérjét kifejező transzgenikus vonalakban a jelölt célszervek jól láthatóak, így lehetővé teszik azok *in vivo* vizsgálatát ugyanazon egyedben eltérő időpontokban, az állat feláldozása nélkül.

Vizsgálataink során célunk ösztrogén hatású anyagok vizsgálata volt a vérben és az érrendszerben zöld (GFP) és vörös (RFP) fluoreszcens fehérjét kifejező transzgenikus zebradánió vonalakon.

Az embriókat 4 napon át különböző koncentrációjú ösztrogén (17- β -ösztradiol), atrazin és biszfenol-a oldatokkal kezeltük. Naponta vizsgáltuk az életben maradást, a kelést és a fénymikroszkóp alatt megfigyelhető fejlődési rendellenességeket. A 4. napon fluoreszcens mikroszkóp alatt a vér- és érrendszerben megfigyelhető elváltozásokat is detektáltuk. Az elváltozásokat fénymikroszkóppal rögzítettük.

Kimutattuk, hogy a kezelt lárvákban a vizsgált anyagok hatására számos elváltozás alakul ki az érrendszer fejlődésében és a keringésben (erek összenövése, hiánya, rendellenes szívműködés, vérsejtek szétszóródása a testben). Igazoltuk, hogy a transzgenikus zebradánió vonalak valóban jól alkalmazhatóak toxikológiai vizsgálatokhoz és kitűnő alternatívát jelenthetnek a költségesebb vizsgálatok előkísérleteihez, vagy azok kiváltásához. Segítségükkel lehetőség nyílik olyan fejlődési rendellenességek megfigyelésére is, amelyek a vad típusú lárvák vizsgálatával *in vivo* rejtve maradnak.

6. Köszönetnyilvánítás

Köszönetünket szeretnénk kifejezni konzulenseinknek, Bakos Katalinnak és Dr. Csenki Zsoltnak a vizsgálataink során és a dolgozatunk összeállításában nyújtott segítségével. Szeretnénk még megköszönni Dr. Urbányi Béla tanszékvezetőnek, valamint a Halgazdálkodási Tanszék minden dolgozójának a munkánkhoz nyújtott segítségét. Valamint Bencsik Dórának és Kovács Robinak.

A dolgozat a TÁMOP-4.2.1.B-11/2/KMR-2011-0003 „Az oktatás és kutatás színvonalának emelése a Szent István Egyetemen” c. pályázat támogatásával valósult meg.

7. Irodalomjegyzék

Abbott A. (2005): "Animal testing: More than a cosmetic change" *Nature* 438, 144-146,

Ackerman F. (2007): The Economics of Atrazine. *International Journal of Occupational and Environmental Health*.)

Adrian J. Hill, Hiroki T., †W. Heideman, and Richard E. Peterson (2005): *Toxicological Sciences* 86(1), 6–19

Anway MD, Skinner MK (2006): Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors. *Endocrinology* 147: S43–S49

Bachmann, J. (2002): Entwicklung eines Teratogenitäts - Screening - Tests mit Embryonen des Zebraäbrblings *Danio rerio*. Doctoral thesis, TU Dresden, Germany.)

Baronti C., Curini C., D'Ascenzo G., Di Corcia A., Gentili A., Samperi R. (2000): Monitoring natural and synthetic estrogens at activated sludge sewage treatment plants and in receiving river water. – *Environ Sci. Technol.* 24:5059-5066.

Berrill M., Mackenzie C., Metcalfe C., Pauli B. (2003): Gonadal differentiation in frogs exposed to estrogenic compounds, *Environmental Toxicology and Chemistry*, Volume 22, Issue 10, pages 2466-2475, October 2003

Boros M., (2007): Állatkísérletek az orvostudományban, Szegedi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Sebészeti Műtétan Intézet Egyetemi jegyzet, pp 2-) 108,

Boverhof Darrell R., Chamberlain Mark P.; Elcombe Clifford R. (2011): Transgenic Animal Models in Toxicology: Historical Perspectives and Future Outlook Source: *TOXICOLOGICAL SCIENCES* Volume: 121 Issue: 2 Pages: 207-233 DOI: 10.1093/toxsci/kfr075, Published: JUN 2011, Times Cited: 0 (from Web of Science)

Burridge E. (2003): Bisphenol A product profile. *Eur Chem News*: 14–20.

C.G. Daughton, T.A. Ternes (1999): *Environmental Health Perspectives* 107 907.

CERHR Expert Report for Bisphenol A (2007): National Toxicology Program, u.s. Department of Health and Human Services

Crain DA, Guillette LJ Jr, Rooney AA, Pickford DB (1997): Alterations in steroidogenesis in alligators (*Alligator mississippiensis*) exposed naturally and experimentally to environmental contaminants. *Environ Health Perspect* 105: 528–533.

CRAIN DA, JANSSEN SJ, EDWARDS TM, HEINDEL J, HO SM, HUNT P, IGUCHI T, JUUL A, MCLACHLAN JA, SCHWARTS J, SKAKKEBAEK N, SOTO AM, SWAN S, WALKER C, WOODRUFF TK, WOODRUFF TJ, GIUDICE LC, GUILLETTE JR LJ (2008): Female reproductive disorders: the roles of endocrine disrupting compounds and developmental timing. *Fertil Steril* 90:911–940

Darrell R. Boverhof, P Chamberlain, †Clifford R., †F. J. Gonzalez, Robert H. Heflich, L. G. Hernandez et al. (2011): *TOXICOLOGICAL SCIENCES* 121(2), 207–233 Transgenic Animal Models in Toxicology: Historical Perspectives and Future Outlook

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. - *Environ. Sci. Technol.* 32:1549–1558.

Dickerson SM, Gore AC (2007): Estrogenic environmental endocrine-disrupting chemical effects on reproductive neuroendocrine function and dysfunction across the life cycle. *Rev Endocr Metab Disord* 8:143–159.

E. Diamanti-Kandarakio, J-P Bourguignon, L. C. Giudice, R Hower, G. S. Prins, A. M. Soto, R. T. Zoeller, A. C. Gore (2009): Endocrine-Disrupting Chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement. *Endo.-Rev.* 2009, 30:293:342

Eldridge JC, Wetzel LT, Tyrey L (1999): Estrous cycle patterns of Sprague- Dawley rats during acute and chronic atrazine administration. *Reprod Toxicol* 13: 491–499

Fang H, Tong W, Shi LM, Blair R, Perkins R, Branham W, Hass BS, Xie Q, Dial SL, Moland CL, Sheehan DM (2001): "Structure-activity relationships for a large diverse set of natural, synthetic,

and environmental estrogens". Chem. "Szerkezet-hatás összefüggések a nagy sokszínű sor természetes, szintetikus, és a környezeti ösztrogének". Chem. Res. Res. Toxicol. 14 (3): 280–94. doi : 10.1021/tx000208y . PMID 11258977 . Toxicol. 14 (3): 280-94. doi : 10.1021/tx000208y . PMID 11.258.977

Friedmann AS (2002): Atrazine inhibition of testosterone production in rat males following peripubertal exposure. Reprod Toxicol 16: 275–279.

G. Kari, M. Rodeck, A.P. Dicker (2007): Zebrafish: An Emerging Model System for Human Disease and Drug Discovery. Clinical Pharmacology & Therapeutics, 82, 70-70

HAIGHTON, L. et al. (2002): An Evaluation of the Possible Carcinogenicity of Bisphenol A to Humans. J. Reg. Toxicol. Pharmacol. 35: 238-254. Abstract available at: Science Direct)

Hayes T, Haston K, Tsui M, Hoang A, Haeffele C, et al. (2002): Herbicides: feminization of male frogs in the wild. Nature 419: 895–896.

Hayes T, Haston K, Tsui M, Hoang A, Haeffele C, et al. (2003): Atrazine-induced hermaphroditism at 0.1 ppb in American leopard frogs (*Rana pipiens*): laboratory and field evidence. Environ Health Perspect 111: 568–575.

Hill, AJ; Teraoka H; Heideman W. (2005): Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity, Source: TOXICOLOGICAL SCIENCES Volume: 86 Issue: 1 Pages: 6-19 DOI: 10.1093/toxsci/kfi110 Published: JUL 2005, Times Cited: 167 (from Web of Science)

Horn P.& Zsilinszky S. (1983): Akvarisztika, Natura Kiadó, Budapest, pp 188-191.

Juvancz Z. (2011): előadás a Hormonhatást megzavaró anyagok címmel

Markham A. (1994): A Brief History of Pollution (London, Earthscan)

Monosson E.(Topic Editor) (2011): "Toxicity testing methods". In: Encyclopedia of Earth. Eds. Cutler J. Cleveland (Washington, D.C.: Environmental Information Coalition, National Council for

Science and the Environment). [First published in the Encyclopedia of Earth April 26, 2007; Last revised Date April 26, 2007; Retrieved October 30, 2011

Moore A, Waring C (1998): Mechanistic effects of a traizine pesticide on reproductive endocrine function in mature male Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 62: 41–50

N.D Lawson, B.M. Weinstein (2002): In Vivo Emaging of embryonic vascular development using transgenic zebrafish. *Developmental Biology* 248, 307-318

Nagel, R. (2002): The EmbryoTest with the Zebrafish *Danio rerio* – a General Model in Ecotoxicology and Toxicology, *Altex* 19, pp 38-48 /

Nelson LR, Bulun SE (2001): "Estrogen production and action". *J. Am. Acad. Dermatol.* 45 (3 Suppl): S116–24.

PETROVIC, E. ELJARRAT, M. J. LOPEZ DE ALDA, D. BARCELO (2004): Endocrine disrupting compounds and other emerging contaminants in the environment: A survey on new monitoring strategies and occurrence data *Anal Bioanal Chem*, 378: 549: 562

Q. Long, A. Meng, H. Wong, J.R. Jessen, M.J. Farrell, S. Lin (1997): GATA-1 expression pattern can be recapitulated in living transgenic zebrafish using GPP reporter gene. *Development* 124, 4105-4111

Rayner JL, Wood C, Fenton SE (2004): Exposure parameters necessary for delayed puberty and mammary gland development in Long-Evans rats exposed in utero to atrazine. *Toxicol Appl Pharmacol* 195: 23–34.

S.A. Synder, T.L. Keith, D.A. Verbrugge, E.M. Synder, T.S. Gross, K. Kannan, J.P. Giesy (1999): Analytical Methods for Detection of Selected Estrogenia Compounds in Aqueous Mixtures, *Environ Sci Technol*, 33 (16) 2814-2820

Szalai GY. (1987): *Ember és víz. Mezőgazdasági Kiadó*, 266. oldal,

Tavera-Mendoza L, Ruby S, Brousseau P, Fournier M, Cyr D, et al. (2002): Response of the amphibian tadpole *Xenopus laevis* to atrazine during sexual differentiation of the ovary. *Environ Toxicol Chem* 21: 1264–1267

Vallner J. (2004): Bevezetés a környezet tudományba, Segédlet, 53.o-56. oldal

Whitehead SA, Nussey S. (2001): *Endocrinology: an integrated approach*. Oxford: BIOS: Taylor & Francis, ISBN 1-85996-252-1

Wise Amber; O'Brien Kacie; Woodruff Tracey (2011): Are Oral Contraceptives a Significant Contributor to the Estrogenicity of Drinking Water?, Source: ENVIRONMENTAL SCIENCE & TECHNOLOGY Volume: 45 Issue: 1 Pages: 51-60 DOI: 10.1021/es1014482 Published: JAN 1 2011, Times Cited: 3 (from Web of Science)

Internet I.: http://www.halasviz.eu/index.php?ugrik=avizrol_szennyezok

Internet II.: www.icewater.hu/files/8/16/a_magyar_orvosi_kamara_cikke.doc

Internet III.: <http://www.hormonharmonia.hu/eletmod/osztrogen-lebontasa/>

Internet IV.: Health Canada. "Survey of Bisphenol A in Canned Drink Products". http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/securit/packag-emball/bpa/bpa_survey-enquete-can-eng.php. Retrieved 13 March 2009.