

Szent István Egyetem
Mezőgazdaság- És Környezettudományi Kar,
Környezet- és Tájgazdálkodási Intézet
Halgazdálkodási Tanszék

Tudományos Diákköri Dolgozat

A nanoezüst hatásainak vizsgálata zebradánión (*Danio rerio*)

Készítette:
Pelyhe Csilla
Ökotoxikológus MSc II. évf.

Belső témavezetők:
Dr. Csenki Zsolt Imre, tanszéki mérnök
Dr. Hegyi Árpád, tudományos segédmunkatárs
Bakos Katalin, tanszéki mérnök

Tanszékvezető: Dr. Urbányi Béla

Gödöllő
2012

Tartalomjegyzék

1	Bevezetés, célkitűzés és hipotézisek	3
1.1	Bevezetés.....	3
1.2	Célkitűzés.....	4
1.3	Hipotézisek	4
2	Irodalmi áttekintés	5
2.1	Ezüst, háttérinformációk	5
2.1.1	Ezüst - Általános toxicitás	6
2.1.2	Ezüst – Ökotoxicitás.....	7
2.2	A nanoezüst jellemzői.....	7
2.2.1	A nanoezüst hatásai baktériumokra, gombákra és vírusokra	10
2.2.2	A nanoezüst hatásai emlősök szervezetére.....	11
2.2.3	A nanoezüst hatásai a halak szervezetére.....	12
2.3	A halakon történő tesztelés fontossága és előnyei	14
2.4	Mérgeзések hatása a halak szervezetére	15
2.5	A zebradánió.....	16
2.6	Az anyai hatás biológiája	17
2.7	A zebradánió embrió fejlődésének főbb lépései - különös tekintettel az idegrendszer, vese és vérerek, vérképző szervek kialakulására	18
2.8	Szövettani eljárások.....	21
2.8.1	Festési eljárás	22
3	Anyag és módszer	23
3.1	A kísérleti állomány és a vizsgálatok elvégzésének helye	23
3.2	A felhasznált nanoezüst leírása	23
3.3	A kísérletekben használt zebradánió vonalak jellemzése	23
3.4	A nanoezüst hatásának vizsgálata a zebradánió szaporodására (anyai hatás vizsgálat).....	24
3.4.1	A nanoezüst tartalmú oldat készítésének menete	24
3.4.2	A kísérleti állomány tartása és szaporítása	25
3.4.3	Anyai hatás vizsgálatára irányuló kísérletek.....	25
3.5	Szövettani vizsgálatok.....	26
3.5.1	A PAS-festés menete: (többlépcsős küvettasorozat)	26
3.6	Az ikrahéj barrier hatásának vizsgálata	27
3.6.1	Transzgenikus zebradánió embriók nyerése	27
3.6.2	Az embriók és egyes szervek fejlődési rendellenességeinek vizsgálata	27
3.7	Alkalmazott statisztikai módszerek	29
4	Vizsgálati eredmények és megvitatásuk.....	29

4.1	Anyai hatás vizsgálat.....	29
4.2	Anyai hatás vizsgálat – ikrák száma és termékenyülési arány értékelése.....	29
4.3	Az embriók morfológiai értékelésének eredményei	31
4.4	Szövettani elemzés:	32
4.4.1	A kontroll csoport	32
4.4.2	A 0.5 ppm-es nanoezüst csoport	33
4.4.3	Az 1 ppm-es nanoezüst csoport	35
4.5	A nanoezüst hatása a fejlődő embriókra, és az ikrahéj barrier hatásának vizsgálata	37
4.5.1	A héjas embriók túlélése	37
4.5.2	A héjazott embriók túlélése.....	38
4.5.2.2	A vizsgált kezelések közötti összehasonlítások eredményei	38
4.5.3	Az ikrahéj barrier hatásának vizsgálata	39
4.6	Az embriók morfológiai értékelése	40
4.6.1	Morfológiai rendellenességek vizsgálata a héjas és a héjazott csoportokban.....	40
4.6.2	Az embriók fluoreszcensen jelölt szervben fellépő rendellenességek értékelése	40
4.6.2.2	A nanoezüst hatásai az idegrendszer fejlődésére	43
4.6.2.3	A nanoezüst hatásai az érrendszer és vérképző szervek fejlődésére - farok	45
4.6.2.4	A nanoezüst hatásai az érrendszer és vérképző szervek fejlődésére - törzs.....	47
4.6.2.5	A nanoezüst hatásai az érrendszer és vérképző szervek fejlődésére - fej.....	49
5	Hipotézisek megbeszélése	51
6	Következtetések, javaslatok	52
6.1	Anyai hatás vizsgálat.....	52
6.2	A nanoezüst hatása a fejlődő embriókra, és az ikrahéj barrier hatásának vizsgálata	52
6.3	Következtetések összegzése	53
7	Összefoglalás	54
8	Köszönetnyilvánítás	55
9	Irodalomjegyzék	56

1 Bevezetés, célkitűzés és hipotézisek

1.1 Bevezetés

A tógazdasági termelés nélkülözhetetlen technológiai eleme az indukált halszaporítás. Az átfolyó vagy recirkulációs rendszerekben egyaránt a leggyakrabban előforduló ikrakárosítók a vízi penészgombák (*Achlya sp.*, *Saprolegnia sp.*). Az elhalt, nem megtermékenyített ikrákon jó táptalajt találnak, és igen gyorsan felszaporodnak. A kialakult gombafonalakhoz, élő, megtermékenyített ikrák is hozzáragadnak, majd a fonalak később azokat is behálózhatják. Az ilyen összetapadt ikrák oxigénellátottsága nem egyenletes, a fejlődő embriók torzulhatnak, rosszabb esetben egy-egy Zuger-üveg egész tartalma is elpusztulhat.

A leggyakrabban alkalmazott vízpenész elleni szerek a malachitzöld valamint a formalin, ugyanakkor az Európai Parlament és Tanács 1907/2006/EK rendeletének 31. cikke alapján készített biztonsági adatlapok szerint mindkét szer erősen mérgező a halakra és vízi szervezetekre, mutagén hatású, karcinogén hatásuk pedig korlátozott mértékben, de bizonyítható. Az Európai Unió egyértelmű törekvése ezen szerek betiltása, azonban ma még nincs olyan szer, ami kiválthatná használatukat.

A nanotechnológia az utóbbi években mindennapjaink részévé vált. Egyre több termék készül a nanotechnológia alkalmazásával, így a különböző nanoanyagok alkalmazása megfontolandó alternatíva lehet a fenn említett probléma megoldására.

A Szent István Egyetem Halgazdálkodási Tanszékén az elmúlt időszakban több hatóanyagot illetve ezek kombinációit vizsgálták már a malachitzöld lehetséges utódját keresve, amire a nanoezüst tűnik az egyik leginkább esélyesnek az eddigi eredmények alapján. Ahhoz azonban, hogy az ikrák nanoezüsstel történő kezelése beépíthető legyen a tógazdasági haltenyésztés technológiájába számos, elsősorban toxikológiai, vizsgálatot kell elvégezni. A diplomamunkám során ezekbe a vizsgálatokba kapcsolódtam be.

1.2 Célkitűzés

Vizsgálataink során célul tűztük ki a nanoezüst hosszútávú hatásának vizsgálatát az anyahalak szervezetére, 0,5 ppm és 1 ppm koncentrációjú nanoezüst kitettség esetén. További célunk volt megállapítani, hogy milyen hatásokat fejt ki anyailag az utódokra a hosszútávú kezelés. Transzgenikus zebradanió vonalak segítségével vizsgálni kívántuk, hogy van-e barrier hatása az ikrahéjnak a nanoezüst szemcsékkel szemben illetve milyen hatást fejt ki a fejlődő embriók ideg- és keringésrendszerére és a vese fejlődésére a kezelés.

1.3 Hipotézisek

- o A nanoezüst expozíció csökkenti a zebradanió nőtények által letett ikrák számát.
- o Az ikrások nanoezüst kitettsége csökkenti az ikrák termékenyülési arányát.
- o Az anyahalak nanoezüst kitettsége növeli az embriók morfológiai rendellenességének arányát.
- o A nanoezüst kitettség morfológiai elváltozásokat okoz az ikrások bőrén.
- o A nanoezüst kitettség morfológiai elváltozásokat okoz az anyahalak kopolyájában.
- o A nanoezüst kitettség morfológiai elváltozásokat okoz a zebradanió nőtények májában.
- o A nanoezüst kitettség morfológiai elváltozásokat okoz az ikrások veséjében.
- o A nanoezüst kitettség morfológiai elváltozásokat okoz az anyák idegrendszerében.
- o A nanoezüst kitettség morfológiai elváltozásokat okoz a zebradanió nőtények petefészkében.
- o Az ikrák nanoezüst kitettsége csökkenti az embriók túlélését.
- o Az ikrák nanoezüst kitettsége morfológiai elváltozásokat okoz a fejlődő embriókban.
- o Érvényesül az ikrahéj barrier hatása a nanoezüsttel szemben.

2 Irodalmi áttekintés

2.1 Ezüst, háttérinformációk

A bolygónkat felépítő alapvető elemek egyike az ezüst, vegyjele: Ag (latinul: *argentum*, az „arg” szó jelentése „szürke”, „fényes”), rendszáma 47, relatív atomtömege 107,87, sűrűsége 10,49 kg/m³. A fehérén csillogó nemesfém, a természetben elemi állapotban is előfordul, leggyakrabban szulfidásványokban. Valamivel keményebb, mint az arany, könnyen hajlítható, formálható. A fémek között a tiszta ezüstnek van a legnagyobb elektromos és hővezető képessége, valamint a legkisebb ellenállása (NORDBERG ÉS GERHARDSSON 1988).

Levegőbe vagy vízbe jutását természetes folyamatok, például kőzetek eróziója, vagy emberi tevékenységek, például kohászat, ércek feldolgozása, cementgyártás, fényképészeti eszközök gyártása és eliminálása vagy fosszilis anyagok égetése okozhatják (WHO 2002).

Az ezüst négy különböző oxidációs állapotban létezik: Ag^0 , Ag^+ , Ag^{2+} és Ag^{3+} . Az első kettő gyakoribb, az utóbbi kettő vízi környezetben instabil (SMITH ÉS CARSON 1977, WHO 2002). A vízi környezetben az ezüst szabad ezüst ionként (Ag^+) található meg, vagy komplexebb formában részecskék felületén kötötten (ATSDR 1990, WHO 2002).

Az ezüst, mint fém vízben oldhatatlan, de a fémes sók, például az ezüst-nitrát vagy az ezüst-klorid vízben jól oldódnak (WHO 2002).

Az ezüstöt régóta használják a legkülönbözőbb célokra. Már az ókori civilizációk is tisztában voltak az ezüst baktericid tulajdonságával (HILL ÉS PILLSBURY 1939). Sebészeti protézisek és sínek készítésére, pénzverésre, de gombaölő szerként is alkalmazták. A különböző oldható ezüstvegyületeket, például az ezüst-sókat mentális betegségek, epilepszia, nikotinfüggőség, gyomor-bélhurut és fertőző betegségek, köztük a szifilisz és a gonorrhoea kezelésében is alkalmazták (MARSHALL ÉS SCHNEIDER 1977; SHELLEY et al., 1987; GULBRANSON et al., 2000).

Napjainkban az ezüstöt igen széles körben, változatos célokra használják. Többek között ezüst vegyületeket alkalmaznak akkumulátorok, tükrök, katalizátorok, gyógyszerek, növényvédőszer gyártása során, valamint galvanizálási folyamatokban és uszodák, termálfürdők és az ivóvíz higiéniájának fenntartására. Ezüstöt és ötvözetait ékszerek, étkezészetek készítésére, elektromos alkatrészek, forraszok, keményforrasztó ötvözetek, szupravezető, csapágyak, pénzürmék készítése céljából használnak fel (WIJNHOFEN et al., 2009).

1964-2000 között a világ ezüst termelése 7,4-ről 15,5 millió kg-ra emelkedett (SILVER INSTITUTE 2007). Az ezüst kereslet várhatóan tovább emelkedik az ezüst újabb felhasználási

területein (különösen a textil-, műanyag-, és gyógyászati ipar) növekvő felhasználás miatt (WIJNHOFEN et al., 2009).

SMITH ÉS CARSON (1977) vizsgálatai szerint 150.000 kg ezüst jut a környezetbe évente az ipari tevékenység hatására. A világ ezüst termelése 2000-ig majdnem megkétszereződött, és azóta is emelkedik. Az ezüst környezeti háttér-koncentrációja $0,01 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ tiszta vizekben (WHO 2002). Bár az ezüst környezeti szintje elsőre magasnak tűnhet az antropogén eredetű kibocsátások miatt, valójában csak egy kis mennyisége elérhető biológiailag. Az ezüst könnyen kötődik vas-vegyületek, agyagásványok, stb. felületéhez, továbbá a kicsapódás is csökkenti az oldott ezüst mennyiséget a vizes fázisban, így a koncentrációja egyre nagyobb az üledékben, a vizes fázishoz hasonlítva (WIJNHOFEN et al., 2009).

2.1.1 Ezüst - Általános toxicitás

Mivel a leggyakoribb forma az elemi ezüst (0 oxidációs állapot) és a monovalens ezüst ion, a legtöbb toxikológiai adat az ezüst e két kémiai formája vonatkozik. A meglévő környezeti és humán vizsgálatok alapján az ezüst némely formája, különösen azok, amelyekből szabad ezüstionok (Ag^+) szabadulnak fel, sokkal mérgezőbbek, mint mások (WHO 2002). Bár az ezüst toxicitásáról korlátozott információ áll rendelkezésre, a fém ezüst valószínűleg minimális kockázatot jelent az egészségre, azonban az oldható ezüst vegyületek könnyebben felszívódnak és kedvezőtlen hatásokat is kifejthetnek (DRAKE ÉS HAZELWOOD 2005).

Az ezüst széleskörű felhasználási területe lehetővé teszi annak különböző útvonalakon keresztül a szervezetbe kerülését. A lenyelés az elsődleges útvonal az ezüst vegyületek és a kolloid ezüst számára (SILVER 2003). Ezüsttartalmú por vagy füst belégzése általában munkahelyi környezetben fordulhat elő, ipari üzemek vegyi ezüst feldolgozóipar részlegein (pl. ezüst por, ezüst-nitrát, ezüst-oxid, ezüst-klorid, ezüst és kadmium por), ékszerkészítés, és étkezés készítése során (DRAKE ÉS HAZELWOOD 2005). Bőrrel való érintkezés szintén munkahelyi környezetben (ATSDR 1990), valamint égési krém alkalmazása (WAN et al., 1991) vagy ékszerekkel való érintkezés (CATSAKIS ÉS SULICA 1978) során történhet.

A leggyakoribb krónikus kitettséggel összefüggő egészségügyi hatás a bőr permanens szürke vagy kékesszürke elszíneződése (*argyria*), elsősorban a napfénynek kitett régiókban és a szem környékén (*argyrosis*) (ATSDR 1990; DRAKE ÉS HAZELWOOD 2005). Ezüstsók tartós fogyasztása, alacsony dózisban a máj és a vesék zsíros degenerációját és a vörsejtek elváltozását okozza (VENUGOPAL ÉS LUCKEY 1978). Az oldódó ezüst-vegyületek hosszú távú expozíció után képesek kis mennyiségben felhalmozódni az agyban és az izmokban (FUNG ÉS BOWEN 1996).

Az ezüst nem minősül mérgező anyagnak (CHEN ÉS SCHLUESENER 2008), mivel a különböző formáit nem találták károsnak az immunrendszerre, szív-és érrendszerre, idegrendszerre és a szaporodási szervrendszerre (ATSDR 1990), valamint nem minősül rákkeltő hatású anyagnak (FURST ÉS SCHLAUDER 1978).

2.1.2 Ezüst – Ökotoxicitás

Kutatások kimutatták, hogy az érzékeny vízi szervezetekre és a rovarok (*Insecta*), a pisztrángfélék (*Salmonidae*) és a lepényhalfélék (*Pleuronectidae*) szervezetére már $1-5 \mu\text{g.L}^{-1}$ (0.001 - 0.005 ppm) koncentráció letális lehet (BRYAN ÉS LANGSTON 1992, WOOD et al., 1994). Továbbá már alacsony koncentráció esetében is káros hatása van a növekedésre (EISLER 1997).

Az ezüst bioakkumulációs készségét több vizsgálatban vizsgálták. SANDERS ÉS ABBE (1987) úgy találta, hogy tengeri algák már $2 \mu\text{g ezüst.L}^{-1}$ (0.002 ppm) koncentráció esetében is jelentős mennyiségű ezüstöt halmoztak fel. Tengeri kagylók az algákhoz képest nagyobb mértékben halmozták fel testükben az ezüstöt, valamint egyes puhatestűek üledékből is képesek felvenni az ezüstöt (WIJNHOFEN et al., 2009).

A kagylók (*Bivalvia*), csigák (*Gastropoda*), és ízeltlábúak (*Arthropoda*) mind képesek bizonyos mértékben felhalmozni testükben az ezüstöt, melynek mennyisége függ az ezüst biológiai elérhetőségétől. A bioakkumulációt befolyásolja az állatok kora, mérete, neme, reprodukív állapota, általános egészségi állapota és a szervezetük anyagcseréje, továbbá a víz hőmérséklet, sótartalom, oldott oxigén tartalom, zavarosság, és más vegyületek jelenléte. (PRESLEY et al., 1990).

Korábban úgy vélték, hogy az ezüst felhalmozás a szabad ezüst-ion biológiai elérhetőségétől függ, azonban REINFELDER ÉS CHANG (1999) kimutatta, hogy az AgCl jelenléte az a faktor, amely hozzájárul az ezüst felvétel növekedéséhez (FORTIN ÉS CAMPBELL 2000).

2.2 A nanoezüst jellemzői

A nanotechnológia gyűjtőnév az alkalmazott tudomány és technika széles területeit fedi le, ezek legfőbb közös vonása az anyag tulajdonságainak meghatározása, illetve eszközök készítése 100 nanométernél kisebb léptékben. E multidiszciplináris területen olyan tudományágak működnek együtt, mint a kolloid-kémia, a félvezető-fizika, vagy a szupramolekuláris-kémia. A *nanosz* görög eredetű szó, jelentése törpe. Egy nanométer 10^{-9} méter (ASTM INTERNATIONAL, 2006).

A kolloidok olyan oldatok, amelyekben igen apró méretű, 1 - 500 nanométer méretű szemcsék vannak oldva, diszpergálva. A *kolla* görögül enyvet, a *kolloid* enyvszerűt jelent (internet1).

Annak ellenére, hogy a természetben az ezüst koncentrációja jelenleg nem éri el azt a szintet, hogy kockázatot jelentsen, a nanoezüst olyan fizikai és felületi tulajdonságokkal rendelkezik, amelyek veszélyt jelenthetnek az emberi szervezetre és a környezetre egyaránt (LEE et al., 2007). Azonban épp ezen új tulajdonságok miatt, sokféle célra alkalmazzák, például élelmiszer-technológia (élelmiszer-feldolgozó berendezések, csomagolóanyagok, élelmiszer tárolására), textilipar (antimikrobiális ruházat). Különböző orvosi alkalmazások (pl. sebkezelő termékek, beültethető orvostechikai eszközök) során is felhasználják és ezen a területen még további lehetőségek rejlenek (pl. diagnosztika, gyógyszer vívőanyagok, képalkotási diagnosztika). Egyre szélesebb körben történő felhasználása miatt veszélyt jelenthet a környezetre. Nanoezüstöt alkalmaznak például vízszűrők és mosógépek hatékonyságának növelésére, kihasználva az ezüst antibakteriális hatását, ahonnan szintén bejuthat a vízi környezetbe és az itt élő élőlények szervezetébe. Különösen az a lehetőség ad okot aggodalomra, hogy a nanoezüst partikulákból nagy mennyiségű ion szabadulhat fel (WIJNHOFEN et al. 2009).

A nanoezüst környezetbeli és szervezetbeli sorsát és viselkedését befolyásoló tulajdonságok: a méret, felület, gőznyomás (fontos a folyadékok esetében), kicsapódás és az aggregáció, valamint a kémiai összetétel (beleértve a bevonatokat és a tisztaságot). A nanoezüst eltérő fizikai-kémiai tulajdonságai és biológiai aktivitása, valamint fokozott reakciókészsége (nagy felület) miatt a hagyományos ezüsthöz viszonyítva toxikusabb lehet.

Összességében nagyon kevés információ áll rendelkezésre a nanoezüst specifikus környezeti hatásairól, a környezetbeli sorsáról és az élő szervezetekre kifejtett hatásairól (WIJNHOFEN et al., 2009).

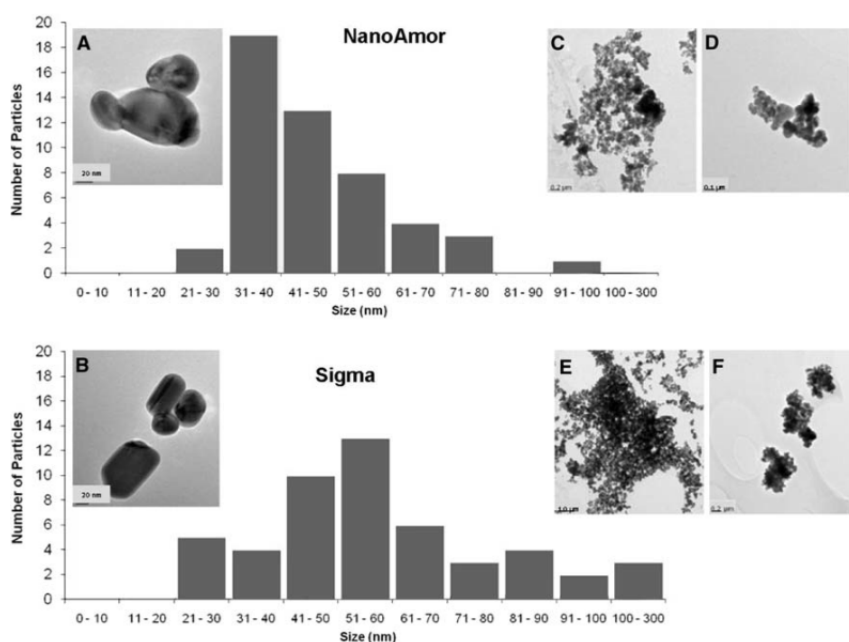
Különböző módokon állítanak elő nanoanyagokat. Az egyik lehetőség a Bottom – Up gyártási módszer, mely során kisebb összetevőkből, atomokból, molekulákból állítanak elő komplexebb nanoanyagokat, amelyet például DNS nanotechnológia, klasszikus kémiai szintézisek, szupramolekuláris kémia, és nanolitográfia területén alkalmazzák. A legtöbb nanoanyag előállítására hagyományosan Top-Down módszereket alkalmaznak, melyek során nagyobb méretű anyagokból, partikulákból, ömlesztett anyagokból, hoznak létre nano méretű anyagokat különböző fizikai eljárások segítségével (darálás, őrlés, egyéb aprítási eljárások), pl szilícium alapú mikroprocesszor gyártás, nanoelektromechanikai rendszerek létrehozása. A nanorészecskék végső mérete igen széles tartományon belül található, ami függ az alkalmazott technológiától és eljárásoktól (internet 2, NISSENSON 2009, EIJKELE et al. 2006).

Különböző formájú (gömb, pálcika alakú, csonka háromszög alakú) ezüst nanorészecskéket lehet szintetikusán előállítani. A csonka háromszög alakú ezüst nanopartikulákat találták a legerősebb antibakteriális hatásúnak (WILEY et al., 2005).

A mesterségesen előállított nano méretű ezüstpartikulákat különböző bevonatokkal látják el, az aggregáció megelőzése céljából, például az Aldrich Materials Science megvételre kínált ezüst nanoszemcsékre egy eljárás során citrát-stabilizált felületet alakítanak ki. Ez a citrát alapú anyag gyengén kapcsolódik a nanorészecskék felületéhez, és így biztosítja a hosszú távú stabilitást. Ha a nanorészecskék oldatba kerülnek, a felületükkel molekulák kapcsolódnak össze és létrehoznak egy kétrétegű töltést, ami stabilizálja a részecskéket, és megakadályozza az aggregációt (internet 3).

LABAN et al. (2009) megállapította, hogy a Sigma Ag <100 nm nanorészecskék mérettartománya igen széles (21-280 nm), a mért részecskék több mint fele 21-60 nm-es mérettartományba esett 96 órával a szonikálás után (1. ábra). A NanoAmor (35 nm) vizsgálata során megállapította, hogy a részecskék 29-100 nm közötti mérettartományban találhatók, és a partikulák többsége 31-50 nm közé esett 96 órával a szonikálást követően. Az ultrahangos szonikálás az aggregátumok kialakulásának csökkenését eredményezte az egyszerű összekeveréshez képest, a nanorészecskék méretétől függetlenül.

Az ezüst nanorészecskék méretének azonosítása transzmissziós elektronmikroszkóppal (TEM) történt. Összesen 50 Ag nanorészecskét mértek le, digitális képek elemzésével (Sigma Scan). A tesztoldatokból a szonikálás és keverés után 96 órával vették a mintákat, melyekről a fényképek készültek. A fényképek μm lépték mellett készültek.



1. ábra: A Sigma-Aldrich < 100 nm és NanoAmor 35 nm ezüst nanorészecskék méret megoszlása 96 órával a szonikálás és keverés után LABAN et al. (2009).

2.2.1 A nanoezüst hatásai baktériumokra, gombákra és vírusokra

A nanoezüst hatékonyan elpusztítja a Gram-negatív (pl. *Acinetobacter*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Vibrio* és *Acinetobacter* fajok) és a Gram-pozitív (pl. *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Listeria*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* fajok) baktériumok széles körét (BURRELL et al., 1999; YIN et al., 1999), antibiotikum-rezisztens törzseket is beleértve (pl. methicillin-rezisztens és vancomycin-rezisztens *Staphylococcus aureus* és *Enterococcus faecium*) (WRIGHT et al., 1998; PERCIVAL et al., 2007). Azt is megállapították, hogy az ezüst nanorészecskék (átlagosan 22,5 nm) fokozzák a különböző antibiotikumok antibakteriális hatását (SHAHVERDI et al., 2007). Az ezüst nanorészecskék méret függő (átmérő 1-450 nm) antimikrobiális hatásáról számoltak be Gram-negatív (BAKER et al., 2005; MORONES et al. 2005; PANACEK et al. 2006) és Gram-pozitív baktériumok (PANACEK et al. 2006) esetében egyaránt. A nanorészecskék nagy felülete hatékonyabb antibakteriális eszközt biztosít még nagyon alacsony koncentrációban is. A méreten és a koncentráción kívül alak-függő is az ezüst nanorészecskék antibakteriális hatása (PAL et al., 2007).

Az ezüst ionok ismert tulajdonsága többek között a tiol csoportot tartalmazó enzimek gátlása, valamint hogy a tiol csoportot tartalmazó aminosavakhoz könnyen kötődnek. Ez a tiol csoportokkal való kölcsönhatás valószínűleg alapvető szerepet játszik a baktériumok elpusztításában, azonban még nem tisztázott, hogy ez önmagában felelős-e a légzési lánc és az oxidatív foszforiláció szétkapcsolásáért és a citoplazma membránon a protonpumpa működésének összeomlásáért (LIAU et al., 1997).

A nanoezüst hatékony és gyors, széles spektrumú gombaölő szer, elpusztítja többek között az *Aspergillus*, *Candida* és *Saccharomyces* fajokat (WRIGHT et al., 1999). Továbbá kísérletekben megállapították, hogy az ezüst nanorészecskék (átmérő :13.5 nm) hatékonyan elpusztítják a szarvasmarha *mastitis* mintákból izolált élesztőt (KIM et al., 2007).

Az ezüst nanorészecskék gátolják a *HIV-1 vírus* replikációját (SUN et al., 2005). Érdekes megfigyelés, hogy az arany nanorészecskék (átlagos átmérő 10 nm) viszonylag alacsony anti-HIV-1 aktivitásához (6-20%) képest az ezüst nanorészecskék aktivitása 98%. Ezen kívül az ezüst nanorészecskék méret-függő antivirális hatása bizonyosodott be a *HIV-1 vírus* vizsgálata során (ELECHIGUERRA et al., 2005). Kizárólag az 1-10 nm-es tartományban mutattak ki kölcsönhatást a nanorészecskék és a *HIV-1 vírus* között.

2.2.2 A nanoezüst hatásai emlősök szervezetére

Több emlős fajon végzett *in vitro* és *in vivo* toxicitási vizsgálatban kimutatták, hogy az ezüst nanorészecskék képesek belépni a sejtekbe és sejtkárosodást okozni (HUSSAIN et al., 2005; JI et al., 2007).

Elhullás: Patkányokon végzett kísérletek során megállapították, hogy rövid távon csak magas dózisú ezüst kitettség okoz elhullást (intravénás adagolás (LD_{50} : 67 mg.kg^{-1}) SCHMAEHL ÉS STEINHOFF 1960, ismételt orális expozíció $1680 \text{ mg Ag.kg}^{-1}.\text{nap}^{-1}$ -négy nap, ATSDR 1990). Vemhes patkányokon végzett kísérletek során, az alkalmazott magas Ag^+ koncentráció ($250 \text{ mg/kg AgCl/nap}$) megzavarta az embriók fejlődését és az újszülöttek pusztulását eredményezte (SHAVLOVSKI et al., 1995).

Akkumuláció: Inhalációs kísérletek során kimutatták, hogy ezüst nanorészecskéknek kitett patkányok májában, orrjáratában, tüdejében és agyában ezüst halmozódott fel (TAKENAKA et al., 2001; JI et al., 2007, OBERDORSTER 2004).

Idegrendszer: Rágcsálókat vizsgálva megállapították, hogy az ezüst változásokat okoz az embriók idegrendszerének fejlődésében (RUNGBY et al., 1987). Egy idegrendszer fejlődését modellező *in vitro* kísérletben, megállapították, hogy az Ag^+ ionok káros hatással vannak a sejtek osztódására és életképességére (POWERS et al., 2010a).

Légzőszervrendszer: SUNG et al. (2008) egy 90 napos inhalációs patkánykísérletet végzett, 18 nm-es ezüst nanorészecskékkel, melyben a légzésfunkciók csökkenését állapították meg, légzési térfogat, perctérfogat és a maximális belégzés áramlás csökkenést, valamint gyulladásos morfológiai elváltozásokat figyelt meg a tüdőben. Vizsgálatok kimutatták, hogy a nano méretű ezüst partikulák olyan elváltozásokat okoznak a tüdőben, melynek hatására csökken az oxigén transzport (LAM et al., 2004), valamint az immunsejtek a partikulák köré gyűlnek, ami akár fulladást is okozhat, mivel így elzárják a hörgők járatait (WARHEIT 2004).

Szövettani vizsgálatok: Patkányok máj szövettani vizsgálata során mindkét nem esetében citoplazmatikus vakuólum képződést figyeltek meg. Ezen kívül több esetben is góciókban a máj elhalása volt látható a magas dózisú csoportban (JI et al., 2007). 60 nm-es ezüst nanorészecskék 28 napos ismételt dózisú orális vizsgálata során a patkányok májkárosodása mellett az ALP (alkalikus foszfatáz) szint növekedését és szövettani elemzések során a centrális véna tágulását, az epecsatorna megvastagodását és megnövekedett góciókat figyeltek meg (KIM et al., 2008). Egy másik kísérletben kolloid ezüst intravénás beadását követően a patkányok tüdő-ödéma miatt pusztultak el, valamint a májon, lépén és a vesén barna elszíneződés jelentkezett (SCHMAEHL ÉS STEINHOFF 1960).

Vérparaméterek: Patkányok ismételt orális toxicitás vizsgálata során 60 nm-es ezüst nanorészecskék hatására változásokat állapítottak meg a vörösvértestek vizsgálata során (emelkedett vörösvértest szám, hemoglobin és hematokrit érték) és a véralvadási paraméterekben is (KIM et al., 2008).

Bőr: Egerek esetén 1%-os nanoezüst krém (96,1% <50 nm) alkalmazása gátolta a dinitrobenzol okozta allergiás *kontakt dermatitis* kialakulását (BHOL ÉS SCHECHTER 2005). Hasonló gyulladáscsökkentő hatást állapítottak meg tengerimalacok esetében (BHOL et al., 2004), valamint sebgyógyulást vizsgáló sertés modellek segítségével kimutatták, hogy a seb nanoezüst tartalmú krémmel történő bevonása elősegíti a sebgyógyulást (WRIGHT et al., 2002), azonban nagy dózisú nanoezüst részecske helyi gyulladáshoz vezethet (SUNG et al., 2008).

Karcinogenitás: Krónikus *subcutan* vizsgálatok során patkányok a kolloid ezüstöt (1,75-2,5 mg hetente) viszonylag jól tolerálták, eltekintve az argyria kialakulásától, valamint a vizsgált 26 patkányból 8 (31%) esetében, rosszindulatú daganatok alakultak ki. Ezek közül 6 állat esetében a daganat a *subcutan* injekció helyén keletkezett (FURST ÉS SCHLAUDER 1978).

2.2.3 A nanoezüst hatásai a halak szervezetére

Kutatások során megállapították, hogy az ezüst az egyik legmérgezőbb fém az édesvízi halak szervezetére. Az ezüst ionos formája különösen toxikus a különböző édesvízi fajok szervezetére. LC₅₀ értékeket 0,01 - 70 µg/L (0,0001 - 0,007 ppm) között állapítottak meg különböző fajok esetében (NEBEKER et al., 1983; LEBLANC et al., 1984; LUOMA et al., 1995; HOGSTRAND ÉS WOOD 1998; ZHU et al., 2006, DETHLOFF et al., 2007, NADDY et al., 2007). GRIFFITT et al., (2008) által adult zebradánióra (*Danio rerio*) megállapított LC₅₀ értéke az ezüst nanorészecskékre 7,07 mg Ag/L, míg CHOI et al (2010) 24 órás LC₅₀ értéként 250 mg/L állapított meg. Zebradánió embriók esetében 72 órás és 120 órás LC₅₀ értékeket a 25-50 mg Ag/L (ASHARANI et al., 2008) és 10-15 mg Ag/L (BAR-ILAN et al., 2009) között állapították meg.

Elsősorban a kopolyú ozmoregulációjában okoznak zavarokat az ezüst ionok (LIMA et al., 1982; NEBEKER et al., 1983; BIANCHINI et al., 2002). Régóta ismert, hogy az ezüst-ionok gátolják a Na⁺ és Cl⁻ ionok transzportját a halak kopolyúján (MORGAN et al., 1997). Szívárványos pisztránggal (*Oncorhynchus mykiss*) végzett kísérletek során kimutatták, hogy az ezüst felvétel a kopolyú nátrium-ion csatorna apikális membránján keresztül történik (BURY ÉS WOOD 1999). Néhány tanulmány kimutatta, hogy a halak kopolyúi különösen érzékenyek a nanorészecskék hatásaira. BILBERG et al., (2009) csapósügéren (*Perca fluviatilis*) végzett kísérletei során megállapította, hogy respirációs zavarokat okoznak a nanoezüst részecskék (300 µg/L⁻¹, átlagosan 81 nm). BILBERG et al., (2009) kísérletei során megállapította, hogy a nanoezüst csökkenti a

zebradánió úszási aktivitását, amit valószínűleg a csökkent légzés okoz. GRIFFITT et al., (2009) vizsgálatai során megállapította, hogy a nanoezüst felhalmozódott a kopolyú szövetében 48 óras kitettség után, valamint azt is megállapította, hogy a nanoezüst szignifikánsan nagyobb mennyiségben kötődött a kopolyú szövetéhez, mint az oldható ezüstsók.

HOGSTRAND et al., (1996) szivárványos pisztrágon (*Oncorhynchus mykiss*) végzett kísérletei során megállapította, hogy a májban felhalmozódott ezüst toxicitását csökkentette a *metallothionein* (fémeket megkötő fehérje) (WHO 2002). CHOI et al., (2010) az ezüst felhalmozódását és morfológiai elváltozásokat figyelt meg a máj szöveteiben a nanoezüsttel kezelt zebradániók (*Danio rerio*) esetében. Számos celluláris változás alakult ki, többek között a májsejtek közötti összeköttetések változása, DNS töredezettség, és kromatin kondenzáció volt megfigyelhető. Ezüst-nanorészecskék felhalmozódását figyelték meg medaka (*Orizias latipes*) embriók esetében az agyban, herében, májban, és a vérben (KASHIWADA, 2006).

Zebradánió (*Danio rerio*) halfajon végzett kutatásokban megállapították, hogy az ezüst nanorészecskék befolyásolják az embriók korai fejlődését és túlélését, növelik a keringési és fejlődési rendellenességek előfordulását, és a késleltetett kelést okoznak (LEE et al., 2007, YEO ÉS KANG, 2008, ASHARANI et al., 2008; BAR-ILAN et al., ET AL., 2009; GRIFFITT et al., 2008). Alacsony koncentrációban nincsenek káros hatással a fejlődésre vagy a túlélésre, bár a lárvák úszási aktivitását csökkentik (POWERS et al., 2010b). YEO ÉS KANG (2008) által 10-20nm-es nanoezüsttel, 10 és 20 ppt koncentrációkban végzett vizsgálatokat, melyek során fejlődési rendellenességeket (rendellenes notochord fejlődés (rövid és csavart), fej és szik méret, szem hiánya, gyenge szívverés, ödémák megjelenése) figyelt meg a kezelt zebradánió embriók esetében, valamint a kelési arány és bizonyos gének expressziójának csökkenését figyelték meg. LABAN et al., (2009) Sigma (<100 nm) nanoezüst hatásait vizsgálták fürge cselle (*Pimephales promelas*) embriók túlélését és fenotípusos torzulásait megfigyelve, egy 96 óras statikus tesztben. Különböző fejlődési rendellenességeket figyelték meg az embriókon (többek között a halak úszóhólyagjának hiánya, perikardiális- és sziködémák megjelenése, test megcsavarodása és különböző bevezetések megjelenése). Ebben a vizsgálatban azt is megállapították, hogy a nanoezüst hatásai függetlenek a nanopartikulák méretétől, bár más vizsgálatokban azt állapították meg, hogy a toxicitás fordítottan arányos a mérettel (FUJIWARA et al., 2008; CARLSON et al., 2008).

Más vizsgálatokban kimutatták, hogy ezüst nanorészecskék kromoszóma rendellenességet és DNS-károsodást okoznak és képesek sejtproliférációt indukálni zebradánió sejtvonalakban (ASHARANI et al. 2007). WISE et al., (2009) ezüst nanopartikulák genotoxikus hatását állapította meg medaka sejtkultúrát vizsgálva. Megállapították, hogy 30 nm-es ezüst nanorészecskék kromoszóma aberrációt okoztak a medaka sejtekben.

A nanoezüst képes bejutni a fejlődő zebradánió agyába és apoptózist okozni a fej régiójában valamint megváltoztathatja fejlődési gének kifejeződését (ASHARANI et al., 2008; YEO ÉS YOON, 2009).

2.3 A halakon történő tesztelés fontossága és előnyei

Sok tudományterület korábban kizárólag emlősöket használt fel a kutatások modellezéséhez. Általában egyes vegyületek hatásvizsgálatát csak egy bizonyos rendszertani csoportba tartozó állatokon végzik el, mivel a fejlesztők csak a célcsoportra gyakorolt hatásra kíváncsiak (MUKHI et al., 2005) azonban az ökotoxikológia fontos feladata, hogy ezen anyagok hatásait megállapítsa a velük kapcsolatba kerülő non-target szervezetekre is.

A hal, mint taxonómiai csoport az egyetlen kizárólag vízben élő gerinces és ezért nélkülözhetetlen része az integrált toxikológiai és ökotoxikológiai vizsgálatoknak (BRAUNBECK ÉS LAMMER 2006). A halak már régóta a vízminőséget jelző indikátor szervezetek és a továbbiakban is, bár más módon, de őrzői lehetnek ivóvíz bázisunknak (BRAUNBECK ÉS LAMMER 2006).

Mára már nemzetközi szinten is felismerték, hogy a hal az egyik legjobban használható vízi szervezet a környezeti terhelések vizsgálatához. Az OECD (Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet– Organisation for Economic Co-operation and Development) irányelveknek megfelelően a halakat használják tesztállatként az akut toxicitás vizsgálatoknál (OECD 203), a korai életszakaszban történő mérgezéses (OECD 210), az embrión végzett rövid hatásidejű (OECD 212) valamint fiatal egyedek növekedésére irányuló toxikológiai vizsgálatokhoz.

Másrészről az animal welfare mind inkább nagyobb hangsúlyt kap az ökotoxicitási vizsgálatoknál, és ez arra ösztönzi a kutatókat, hogy új utakat keressenek és/vagy tovább finomítsák, kidolgozzák egy elsődleges és állandó halból származó sejtvonalt, valamint halembriók vizsgálatára alapozott módszereket (BRAUNBECK ÉS LAMMER 2006).

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 a nem táplálkozó lárvá előtti stádiumon történik (NAGEL, 2002). Ez érdekes joghézag, mely sok tekintetben megkönnyítheti a kutatók munkáját.

MCKIM (1977) vizsgálatai során arra a következtetésre jutott, hogy a hosszú távú toxikológiai vizsgálatok során 80%-ban jól detektálható eredményeket kapunk korai életstádiumban lévő halakat alkalmazva. Az általa elvégzett 56 vizsgálat során, melyeket a különböző

életszakaszokban végzett mintegy 34-féle szerves és szervetlen vegyülettel, azt tapasztalta, hogy legérzékenyebb korosztály az embrió és a lárva korosztályok voltak. Több tanulmány foglalkozott azzal, hogy mely fejlődési stádium a megfelelőbb az akut toxikológiai vizsgálatokhoz. CASTANO et al., (1994) vizsgálatukban zebradanió embriók és egy RTG-2 nevű szivárványos pisztrángtól (*Oncorhynchus mykiss*) származó sejtvonal akut toxikológiai vizsgálatának eredményeit hasonlították össze és azt találták, hogy az embriók sokkal érzékenyebben reagáltak a kezelésre. Más kísérletek is sikerrel alkalmazták a zebradanió embriókat ökotoxikológiai vizsgálatokban (NAGEL, 2002).

BRAUNBECK et al., (2005) megállapították, hogy az OECD által kiemelt fajok közül a zebradanió az, melyre a legnagyobb eséllyel lehetne egy működőképes rutin toxikológiai tesztet kialakítani. Ennek oka részben abban keresendő, hogy ennek a fajnak az embrionális fejlődése a legismertebb a többi faj közül.

Bár az embriókon történő tesztelés igen kiváló lehetőségeket kínál a kutatók számára, azonban nem szabad megfeledkezni arról, hogy az ikrahéj nagymértékben csökkentheti a vizsgált anyag felszívódását. Erre megoldást jelent az embriók „héjazása”, melyre több módszer is rendelkezésre áll. A héjazásra abban az esetben nincs szükség amennyiben a vizsgált vegyület lipofil (BRAUNBECK, 2005).

2.4 Mérgezések hatása a halak szervezetére

Vízi életformájukból adódóan a halak teljes bőrfelületükkel és kopolyájukkal közvetlenül érintkeznek a vízbe került mérgező anyagokkal. Ezeken a szerveken át jutnak be a mérgeanyagok a szervezetbe, illetve már itt kifejtik káros hatásukat.

A kültakaró védi a halat a külső, káros hatásoktól, súrlódáscsökkentő szerepe van és ingerfelfogó szervként is működik. Két rétegből áll: felül a hámréteg, alatta az irharéteg található. A felső rétegbe ágyazva számos egysejtű mirigy működik, a legfontosabbak a nyálkát termelő kehelysejtek (HORVÁTH, 2000). A bőrön kialakuló mérgező hatás megjelenhet bőrirritáció formájában, rendellenes hámlásban, és a nyálkatermelés túlzott megnövekedésében, illetve ellenkező esetben akár teljes megszűnésében is.

A kopolya morfológiai és élettani egységet alkot (a gázcserében és az ionszabályozásban van szerepe), továbbá a gázcsere igen nagy felületen zajlik a lemezek 2-4 µm vastagságú hámsejtjein keresztül (HORVÁTH, 2000). E jellemzők is mutatják a kopolya sérülékenységét, illetve indokolják a vizsgálatát. A szövettani vizsgálatok során megfigyelték a légzőhám elburjánzását, értágulatot, vérbőséget, ödémát és nekrozist is a kopolyában, illetve az adatokból arra következtettek, hogy máj lehet a második legérintettebb szerv (MONTEIRO et al., 2005).

Mind a bőrön keresztül, mind a kopolytún át történő felszívódás után a toxikus anyag a vérbe kerül. Majd a maximális koncentráció elérése után, fokozatosan csökken a vérplazmában található mennyisége, ahogy az eloszlása folytatódik a test különböző részeiben. Ezen az úton a mérgeanyagok eljutnak a májba is. A máj legkisebb működési egységei, a májsejtek (hepatocyták) végzik a négy fő élettani funkciót: az anyagcsere folyamatokat, a szekréciót, az epe kiválasztást és a méregtelenítést. Ha toxikus anyagok kerülnek a májba, a káros hatás kompenzálásaként beindul a detoxifikálást végző enzim indukciója, mely során a májsejtek belső membránrendszerének és mitokondriumainak tágulása, a máj tömegnövekedése (hipertrófia) következik be. Ezenkívül gyakran megindul a sejten belül raktározott anyagok (lipidek, glikogén) mennyiségi növekedése is. A lipidmennyiség megemelkedése zsíros degenerációt okoz. Egyre súlyosbodó, irreverzibilis degeneratív változások nekrozishoz is vezethetnek, ezt a folyamatot hepatotoxicitásnak nevezik (KISS, 1997).

2.5 A zebradánió

A zebradánió (2. ábra) napjainkban az egyik legkedveltebb modellállat számos tudományterületen.

A zebradánió (*Danio rerio*) őshazája Élő-India. Elterjedési területe igen széles.

Háta olajbarna, az oldalak és a has alapszíne sárgásfehér. Törzsén a kopolytúfedőtől a farokúszó végéig több sötét acélkék sáv húzódik. A csíkozottság a farok alatti úszóra is kiterjed. A hátúszó alapszíne sárgásbarna, kék szegéllyel, mely kívül fehérén szegélyezett. A kopolytúfedő kék, fehér foltokkal tarkított. A nőstény sokkal teltebb, színei kevésbé élénkek. A hím karcsú, alapszíne aranyárga, csíkjai sötétebbek. Testhossza átlagosan 4,5 cm. (HORN, 1983).

Laboratóriumi körülmények között is könnyen tartható, kis testű csapathalak, melyek a víz, illetve a táplálék minőségére kevésbé érzékenyek, helyigényük kicsi. A halak 3-4 hónap alatt válnak ivaréretté, a nőstényektől akár hetente lehet viszonylag nagy mennyiségű ikrát nyerni. Az embriók fejlődése *ex utero* zajlik így könnyen nyomonkövethető az átlátszó ikrahéjon keresztül. Az embrióknak 24 óras korukra az összes létfontosságú szervük kifejlődik, 72 órával a termékenyülés után kikelnek a lárvák, majd ezt követően 2-3 nap alatt elúsznak és megkezdik önálló táplálkozásukat.

Amennyiben nem a megfelelő körülmények között tartják őket, legelőször a szaporodásbiológiai paramétereik változnak kedvezőtlen irányába, hiszen az állatok az energiájuk nagy részét a kellemetlen környezeti hatások kompenzálására fordítják, és nem ivarsejttermelésre (WOOTON 1998). A zebradániók laboratóriumi szaporítása a természetben élő egyedek ivási szokásainak megfigyelésén alapul. A zebradániók ivását erősen befolyásolja a fotoperiódus. A

természetben és laboratóriumi körülmények között is a napkelte/világítás bekapcsolása utáni első pár órában történik az ívás (SELMAN et al. 1993; SPENCE et al. 2006).

A tudomány számára a magyar származású, de az Egyesült Államokban élő Streisinger György fedezte fel ezt a fajt, mely ugyan nem rendelkezik olyan tulajdonságokkal, ami egyedülállóná tenné a több tízezer ismert halfaj között, mégis megkérdőjelezhetetlen érdemeket szerzett ezeknek a halaknak a tudományos életben.

Ma már nem csak a fejlődésbiológiával foglalkozó tudósok figyelme fordul e halfaj felé. A biotechnológiai kutatásoknak köszönhetően, ma már elkészült a zebradánió teljes genomjának térképe továbbá több ezer mutáns vonal létezik a különböző laborokban. A legtöbb emlősökön végezhető manipulációs eljárás is adaptálva van már rájuk, így megnyílt az út számos más tudományterület előtt is, hogy kísérleteinek alanyául ezt a halfajt válassza. Az élő szervezetben lejátszódó folyamatok, az öregedés, a rák, a vérképzőrendszeri, illetve a különböző szervi rendellenességek és betegségek genetikai meghatározottságának értelmezése, vizsgálata, ma már részben a zebradánión végzett vizsgálatoknak köszönhető (CSENKI et al. 2006). Széleskörben használják fejlődésbiológiai és genetikai (EISEN 1996; GRUNWALD és EISEN 2002), gerontológiai, (GERHARD és CHENG 2002), tumorbiológiai (LIESCHKE és CURRIE 2007), keringési- (NEMTSAS et al. 2010), illetve idegrendszeri betegség (KABASHI et al. 2010), viselkedésbiológiai, (ENGESZER et al. 2004; SPENCE és SMITH 2005), és ökotoxikológiai vizsgálatokhoz (ANKLEY és JOHNSON 2004; FENSKE et al. 2005; HILL et al. 2005; SANTOS et al. 2007).



2. ábra: Zebradánió (*Danio rerio*) hím

2.6 Az anyai hatás biológiája

A halaknál, a termékenyüléstől a blasztula stádiumig, az embrionális sejtek genomja inaktív és ebben a korai időszakban az embrió fejlődését az anyából származó anyagok (a petesejtben jelenlévő RNS-ek, fehérjék, és mitokondriumok) szabályozzák, melyek az oogenezis során szintetizálódnak és halmozódnak fel az oocytában (BALLY-CUIF et al. 1998). Az anyából

származó szabályozó faktorok irányítása alatt a sejtosztódások gyorsan és szinkronizáltan zajlanak le az embrióban (NEWPORT és KIRSCHNER 1982; KANE és KIMMEL 1993).

Ezt a korai szakaszt követi a midblasztula átmenet (az angol kifejezésből elterjedt rövidítése: MBT), amit az időben elnyúló, ciklikusságukat elvesztő sejtosztódások és a transzkripció kezdete jellemeznek (GERHART 1980), ez az időpont egybeesik a gasztruláció kezdetével (NEWPORT és KIRSCHNER 1982).

Az anyai hatás az embriógenesis folyamatában nem szűnik meg az MBT-nél, hanem továbbra is a kulcsfontosságú fejlődési folyamatok nélkülözhetetlen szabályozó eleme marad (DOSCH et al. 2004; WAGNER et al. 2004), beleértve a dorzo-ventrális tengely kifejlődését (GORE et al. 2005; FLORES et al. 2008), az ivari redők antero-poszterior tengelyének kialakulását (GRITSMAN et al. 1999; LUNDE et al. 2004), a gerincvelő és az ősvarsejtek fejlődését (PELEGRI, 2003). Az anyai hatású géntermékek hozzájárulnak az embrionális fejlődéshez a szervi differenciálódás késői szakaszában is. Erre utal, hogy az anyai géntermékeket még 3 nappal a termékenyülés után is megtalálták a zebradánió lárvákban (RYU et al. 2005) és később is befolyásolták a zebradánió fejlődését.

2.7 A zebradánió embrió fejlődésének főbb lépései - különös tekintettel az idegrendszer, vese és vérerek, vérképző szervek kialakulására

Zigóta időszak (0 – 3/4 h)

Zigóta periódus alatt az újonnan termékenyült ikrát ill. embriót értjük, de csak az első osztódás bekövetkezéséig

Barázdálódás időszak (3/4 - 2 ¼ h)

A fejlődés ezen stádiumában, a sejtek vagy blasztomérák első 7 osztódása következik be, ez az osztódás szinkronizáltan és gyorsan zajlik le.

Hólyagcsíra állapot (2 ¼ - 5 ¼ h)

Az embrió megkezd a midblastula állapotba történő alakulást (midblastula transition, MBT) és megkezdődik az epibólia folyamata is, amely majd a gasztruláció során fejeződik be. A mitózis folyamata a blasztula periódus elején úgynevezett „metaszinkronizált”, tehát az osztódás hullámszerűen megy végbe. A sejtciklusok időtartamának megnyúlása jelzi a midblasztula átalakulás kezdetét. Az MBT kezdete nagyjából a tizedik osztódásra tehető.

Gasztruláció időszaka (5 ¼ - 10 h)

A gasztruláció során egyes területek befordulása következik be, míg más területek növekedésnek indulnak. A befordulás az 50%-os epibólia állapotában indul meg és meghatározza a gasztruláció egészét. Nem sokkal a gasztruláció megindulása után, egy marginális megvastagodásból kialakul az ún. „germ ring” mely övszerűen fogja körbe az embriót. A „gyűrű” belsejében megkezdődik két sejtréteg szétválása, az alsó réteg a hypoblaszt, míg a felső réteg az epiblaszt. A gasztruláció végeztével az epiblaszt rétegből alakul ki az ektoderma, a hypoblaszt rétegből pedig a mezoderma és az entoderma.

A hypoblaszt erőteljes akkumulációja történik az embrió hátközépvonalában, a tengely mentén. Így a gasztruláció végére jól elkülönül a paraxiális és az axiális hypoblaszt. Az axiális hypoblaszt fogja képezni a gerinchúrt és az entodermát. 90% epibólia állapotban (9 h) a DEL sejtek egy része a 16. sejtciklusban van, mások pedig már postmitotikus állapotban vannak. Ezekből a sejtekből alakulnak ki a későbbiekben a gerinchúrt alkotó sejtek, a szomitális izomsejtek valamint sok speciális sejt az agy hátulsó területén.

A szegmentáció (10-24 h)

A szegmentáció folyamán fontos morfológiai változások következnek be, megjelennek a szomiták és az elsődleges szervek kezdeményei valamint feltűnnek az első testrészek is. A szomiták kialakulásával megjelenik az első izomfonal, mely a szomatikus ephiteltől indul és a szomiták háthasi középvonalán végighúzódo gerinchúrhoz kötődik. Ez egy különleges V alakzatot mutat oldalnézetből. Később a horizontális myoseptum is ebben a pozícióban alakul ki. Egy másik utódja a szomitáknak a sclerotoma, melyből a későbbiekben a gerinc porcai alakulnak ki.

Az elővese páros kezdeményei, a harmadik szomita környékén alakulnak ki. A gerinchúr differenciálódása fej-farok irányban indul meg, egyes sejtek vakuólizálódnak, megduzzadnak, ezekből alakulnak ki a strukturális elemek, míg más sejtek a későbbiekben gerinchúr hüvelyét fogják alkotni, mely egy egysejtes réteg. A szegmentáció alatt megtörténik a velőlemez velőcsővé történő záródása, mely a farki végen és a törzsben a gerincvelőt fogja alkotni. Ugyancsak ekkor történik, hogy egyes sejtek az agy és gerincvelő kezdeményekből elvándorolnak, valamint az első neuronok elkezdenek axonokat növesztetni. A három első neuomer nagyobb a többinél, ezekből alakul ki a diencephalon valamint a telencephalon melyek az előagy részei, a harmadik neuomerból a mesencephalon alakul ki. A többi hét egységből rhombomerek fejlődnek.

20-szomitás állapotban (19 h) az elővese vezetéke a törzs egész hosszában kialakul és teljesen körülfogja a sziket. Ez mutatja meg hol is található az embrió anusa, mely egyben a farok

és a törzs határa is, valamint a mezenhima felhalmozódik a farok ventrális részén, itt fognak majd kialakulni a vérszigetek.

26-szomitás állapotban (22 h) a vérszigetek jól láthatóak és elkülöníthetőek az ott folyó vérsejt differenciálódás miatt.

Pharyngula időszak (24-48 óra)

Ebben a periódusban megjelennek az első pigmentsejtek. A szív elkezd dolgozni és megindul a vérkeringés. A szív a Prim-5 állapot (24 h) során válik először láthatóvá, alakja egy egyszerű kúpra emlékeztet, mely a szem elülső vonalában, a szik felett található, előtte pedig egy precardiális zsák látható. Még ebben a ciklusban elkezd verni a szív, ritmusa azonban akadozó. A vérsejtek a vérszigetekben találhatóak, majd a 24-25. óra körül átvándorolnak a szik és a gerinchúr határára ahol, majd az első erek alakulnak majd ki. A Prim-15 állapot (30 h) során az egyenes csövet formáló szív összehúzódásai egyre erőteljesebbek lesznek. A pharynx és a farok között egy egyszerű aortaív valamint egy komplex artériarendszer található melyben lassan cirkulál a vér. Egy kicsit több mint fél úton a farok felé, található egy labirintusra emlékeztető rendszer, mely összeköttetést jelent a farki artériával és vénával. A Prim-25 állapot (36 h) alatt a vér áramlása felgyorsul. A korábban egyenes csőre emlékeztető szív kissé meghajlik. A vérkeringésbe bekapcsolódik a farki artéria és véna, mely már a farok hosszának, háromnegyedére kiterjed. A törzsbe a vér a sziken keresztül tér vissza, ez az út a fő vénán, hátulsó farki vénán és a farok vénán át történik, mely egy jól kifejeződött csővezeték. High-pec állapot (42 h) során a percnkénti szívverések száma eléri a 180-at. Mind a testet, mind a farkat behálózzák az erek. Az ércsatornák mélyen benyomulnak a myotomák közé.

A kelés (48-72 h)

A kelés az embrionális fejlődés utolsó lépcsője, utána már lárvának nevezzük a fiatal állatot. Attól függetlenül, hogy az embrió kikelt vagy sem a fejlődése nem áll le, tehát azok az egyedek, melyeknél a kelés később következik be nem fejletlenebbek. Ebben az utolsó periódusban az embriók hosszanti növekedése folytatódik és ehhez egyre több sziket használ fel.

Long-pec állapot (48 h) során mind a hallókapszulában, mind az oldalvonalkézdemeny mentén megjelennek a speciális idegsejtek (hair cells). A szívverések száma körülbelül 2,5 másodpercnként, mely jól nyomon követhető az egymás mellett elhelyezkedő pitvaron és kamrán. A periódusban már mind az 5 pár aortaív megfigyelhető, ám még nem mindegyik szállít vért. Az első aortaív egy hátsó ága fut keresztül az operculum kézdemenyén. A véráramlás erőteljes. A mellúszó kézdemeny vérellátása az 54. óráig nem alakul ki. A vitellinvénának a jellegzetes legyező alakja jól megfigyelhető ebben a periódusban.

Pec-fin állapot (60 h) során a szív másodpercenként háromszor húzódik össze, ez a későbbi periódusok során sem változik. Az előreugró száj megjelenésének stádiuma (72 h) során Kialakul a kopoltyú vérkeringése (KIMMEL et al.1995).

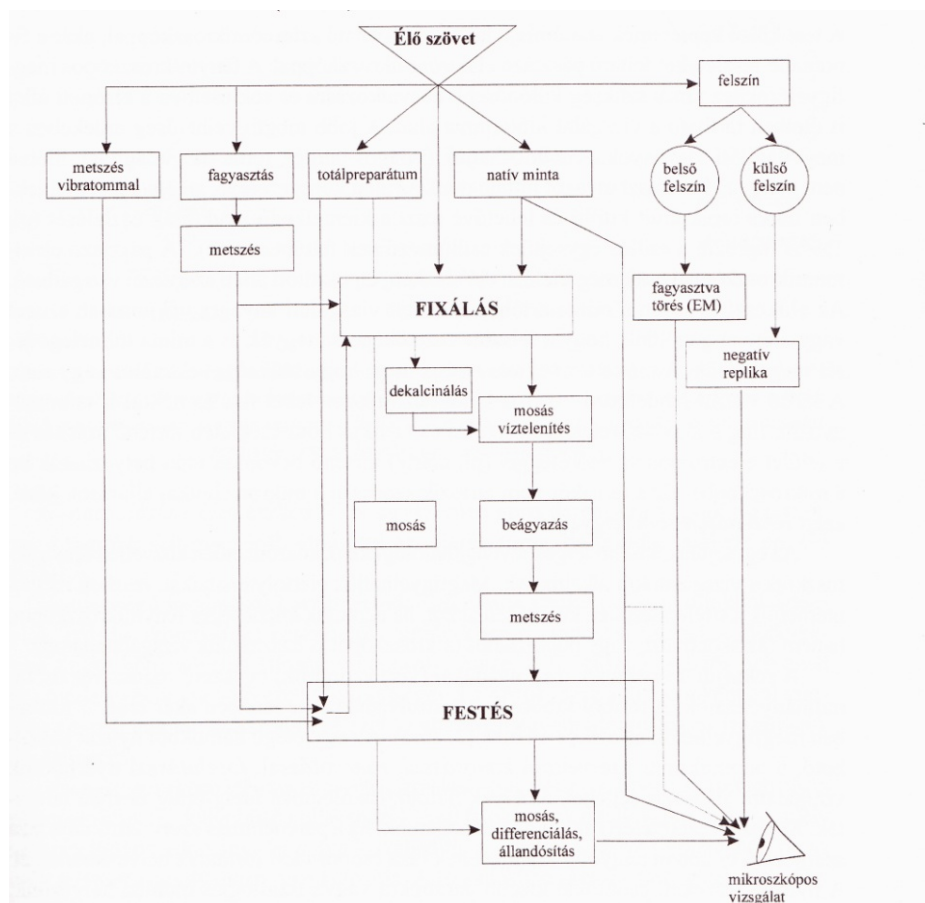
2.8 Szövetteni eljárások

Szövetteni technika (hisztotechnika) azokat az eljárásokat foglalja össze, melyek segítségével az emberi vagy állati szervezetből eltávolított szervrészeket alkalmassá tesszük mikroszkópos vizsgálatra. A sejtstruktúra vizsgálatának egyik fő problémája a sejtek kis méretéből, és transzparens (fényáteresztő) képességükből ered. A mikrotechnikai feldolgozás első lépése a vizsgálati anyagok rögzítése (fixálása), mely nélkül szerkezetük kiszáradás, enzimhatás vagy rothasztó baktériumok okozta bomlás következtében megváltozna (KOMÁROMY, 1989).

A szöveteket felépítő vegyületek sokfélesége miatt nem rendelkezünk olyan általános rögzítőszerrel, amely minden szövetalkotórészt egyaránt fixálna. A rögzítőszer megválasztásakor figyelembe kell venni, hogy milyen szövetelemet, milyen módszerrel kívánunk vizsgálni. Ugyanis egyes festési eljárások csak bizonyos rögzítés alkalmazása után alkalmazhatók sikeresen (KRUTSAY, 1980).

Leggyakrabban a formalint alkalmazzák rögzítőszerként. Előnye olcsóságán és fertőtlenítő hatásán kívül, hogy a rögzítőfolyadék súlymérés nélkül elkészíthető, vegyhatása közel semleges, a lipoidokat nem oldja, és egyes enzimek aktivitását is megőrzi. Formalinrögzítés után a legtöbb festés sikerrel kivitelezhető (KRUTSAY, 1980).

A fixálás után az anyagot alaposan ki kell mosni, majd a szervdarabokból fokozatosan ki kell vonni a vizet. Ennek célja, hogy a fixálás során kialakult tömöttebb struktúrát még fokozni kell, másrészt a minták beágyazása általában a vízzel nem elegyedő paraffinba történik. A víztelenítés ún. felszálló alkoholsorban zajlik, a hígabból a töményebb alkoholba helyezzük az anyagunkat, a legutolsó alkohol a sorban az abszolút alkohol. Az alkoholos víztelenítés után olyan anyagot használunk, amely az alkohollal elegyedik és a paraffinnak oldószere. Ilyen ún. közti (intermedier) anyag pl.: a xilol. A beágyazás végső célja, hogy olyan jól metszhető mintákat nyerjünk, amelyben a biológiai anyag a lehető legkevesebb torzulást mutatja az élőhöz képest. A művelet során a vizsgálandó anyagot folyékony beágyazószerekkel átítatják, és végül ezt a közeget megszilárdítják. A kikeményített, beágyazószerrrel átítatott és körülvevő anyagot nevezik blokknak. A blokk mechanikai tulajdonságai olyanok már, hogy belőle megfelelő vékonyságú metszetek készíthetők. Festés előtt már csak a metszetkészítés van hátra, ez a blokk felszeletelése a vizsgálat céljától függő vastagságban (KOMÁROMY, 1989) (3. ábra).



3. ábra: Az élőlények mikroszkópos vizsgálatának lehetséges folyamata, (MOLNÁR et al. 2001).

2.8.1 Festési eljárás

A sejtek és a szövetek a szokásos metszetvastagságban színtelenek, fénytörésembeli különbségük csekély, ezért finomabb részleteik elkülönítésére színbeli eltéréseket kell létrehozunk, melyre a metszetek festése kínál megoldást.

2.8.1.1 PAS- (periodic acid-Schiff) festés:

Malaprade ismerte fel 1934-ben, hogy a polialkoholok perjódsavval a szénlánc hasadása mellett aldehidekké oxidálhatók. Ezt a reakciót és a keletkezett aldehidek Schiff-reagenssel történő kimutatását McManus vezette be a szövettani technikába 1946-ban. A perjódsav az etilénköteket és azon szénatomok közti kötések hasítja, melyek szabad hidroxilcsoportokat vagy hidroxil- és aminocsoportot hordoznak (1,2-glikolok, 1,2-aminoalkoholok, 1,2-alkil-aminoalkoholok). Paraffin-metszetben ezek a kötéstípusok főként szénhidrátokban (glikogén, mukopoliszacharidok, mukoproteinek) fordulnak elő (KRUTSAY, 1980).

Előkészítése: rögzítés formalinban, illetve glikogén kimutatására pikrinsav-ecetsav-alkoholban, majd beágyazás paraffinba.

A makromolekuláris szénhidrát komponenseket festi meg. Eredménye, hogy a glikogén, fibrinoid, hámnyák, porcalapállomány, amiloid, kolloid, cellulóz, bazális membránok, rácsrostok, a hipofízis bazofil sejtjei és a gombák ibolyásvörösre, a kollagénrostok halványvörösre, és a sejtmagok kékre színeződnek (KRUTSAY, 1980).

3 Anyag és módszer

3.1 A kísérleti állomány és a vizsgálatok elvégzésének helye

A kísérleti állományt a SZIE Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar, Környezet- és Tárgazdálkodási Intézet Halgazdálkodási Tanszéke biztosította, a kísérletekre szintén itt került sor a zebradániós laborban.

Kísérleteink során az egyre nagyobb teret hódító és széles körben alkalmazott nanoezüst hosszútávú hatását vizsgáltuk az anyahalak szervezetére. Vizsgáltuk továbbá, hogy milyen hatásokat fejt ki anyailag az utódokra a hosszútávú kezelés, illetve hogy van-e barrier hatása az ikrahéjnak a nanoezüst szemcsékkel szemben.

3.2 A felhasznált nanoezüst leírása

Az általunk választott anyag a Sigma-Aldrich Silver 576832 - nanopowder, <100 nm szemcseméretű, 99.5% tisztaságú, kereskedelemben beszerezhető nanoezüst. A por kisebb, mint 100 nm-es ezüst partikulákból áll, ellenállása $1.59 \mu\Omega\text{-cm}$, 20°C -on, felülete $5.0 \text{ m}^2/\text{g}$, olvadási pontja 2212°C (lit.).

3.3 A kísérletekben használt zebradánió vonalak jellemzése

AB: Vad típusú, rövidúszójú vonal, az állomány a Streisinger György által használt halak utódaiból áll. A vonalat több különböző speciális keresztezési eljárás révén mentesítették a letális mutációktól, így kifejezetten alkalmassá vált a különböző laboratóriumi vizsgálatokhoz.

Transzgenikus vonalak:

A GATA-1 (globin transcription factor-1) fehérje az erithroid sejtek, eozinofil granulociták és hízósejtek fejlődéséhez (terminális differenciációjához) elegendhetetlenül szükséges transzkripciós faktor. Kulcsfontosságú szerepe miatt a különböző fejlődési stádiumokban a vérsejt képzésben 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 (YAQOOB et al., 2009).

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 transzgén konstrukció segítségével hozták létre, amelyben a zöld fluoreszcens fehérjét kódoló gént (GFP) a Fli-1 gén transzkripciós start helye elé építették (LAWSON ÉS WEINSTEIN 2002).

A neurogenin-1 az idegszövet fejlődése során kulcsfontosságú, szövetspecifikusan kifejeződő fehérje. Az idegi lemez kialakulása során az elsődleges neurogenesis, a primer neuronok differenciálódásának helyét jelzi, halakban komplex mintázatot mutat. A transzgenikus vonal létrehozása során zöld fluoreszcens fehérjét kódoló szakasz elé építették a neurogenin-1 gén előtti 8,4 kb hosszúságú régiót az alkalmazott konstrukcióban. Ez a szakasz magában foglalja a gén átíródását irányító promóter régiót és szabályozó szekvenciákat. Ezt a konstrukciót injektálták zebradánió embriókba, majd a felnőtt halak közül a homozigóta egyedekből alakították ki a vonalat. Ezzel párhuzamosan létrehoztak egy vörös fluoreszcens fehérjét hordozó vonalat is, melynek kialakításának menete megegyezik az előzővel. Tenyésztési eljárások útján kialakított, a két fluoreszcens fehérjét egyidőben hordozó vonal is létezik. Mivel a transzgenikus vonalban a vörös és/vagy zöld fluoreszcens fehérje az idegszövetben fejeződik ki, jól használható toxikus anyagok idegszövetre kifejtett káros hatásainak *in vivo* vizsgálatára (BLADER et al., 2002).

A Wilm's tumor szupresszor gén WT1 egy cink-finger transzkripciós faktort kódol, amely szervek, elsősorban a vesze fejlődésében játszik fontos szerepet. A WT1 és WT2 szabályzó régiókhoz kapcsolt zöld fluoreszcens fehérje segítségével vese-specifikus transzgenikus vonalat hoztak létre. A vonal segítségével a vesében bekövetkező elváltozások figyelhetők meg (BOLLIG et al., 2009).

3.4 A nanoezüst hatásának vizsgálata a zebradánió szaporodására (anyai hatás vizsgálat)

3.4.1 A nanoezüst tartalmú oldat készítésének menete

Hetente készítettünk Falcon – csőbe nanoezüstből 30.000 ppm-es törzsoldatot. A nanoezüst port táramérleggel mértük ki, a hígító vizet mérő henger segítségével, majd ultraszonikáló berendezés segítségével homogenizáltuk a szuszpenziót (2x2 perc, 20%, 40 C). A 3 literes medencékbe automata pipettával mértük be a kellő mennyiségű törzsoldatot és alakítottuk ki a végleges 0.5 ppm-es és 1 ppm-es oldatokat (CHOI et al 2010. kísérletei alapján).

3.4.2 A kísérleti állomány tartása és szaporítása

A zebradánió anyákat 0,5 ppm és 1 ppm koncentrációjú nanoezüst tartalmú oldatokban tartottuk 5 héten át és az utódaikon az anyai hatásból következő fenotípusos változásokat követtük nyomon. A kísérlet hosszát CSENKI et al. (2010) oocyta transzplantációval kapcsolatos kísérletei alapján határoztuk meg.

3.4.2.1 A kísérleti állomány tartása a kísérlet előtt

A kísérletet megelőzően a szaporításra szánt állatokat a Halgazdálkodási Tanszék, Tecniplast zebradániós haltartó rendszerében tartották, ivar szerint szétválogatva. Egy 3 literes medencében 20 egyed került elhelyezésre. A halak a kísérletet megelőzően rendszeresen, hetente ívtak. A szülők recirkulációs rendszerben, 24-25°C-on 550 ± 25 μ S-es vezetőképesség és $6,5 \pm 0,2$ pH mellett, állandó vízminőségi paraméterek mellett, 14/10 órás sötét/világos ciklusban voltak tartva. Naponta kétszer kaptak enni száraz eleséget (SDS Small Grain.), ezt kiegészítettük hetente két alkalommal frissen kikelt sórak (SERA) lárvákkal.

3.4.2.2 A kísérleti állomány tartása a kísérlet alatt

A vizsgálat kezdetén koncentrációnként 10 db véletlenszerűen kiválasztott, kifejlett zebradánió nőtényt helyeztünk a 0.5 ppm és 1 ppm koncentrációjú nanoezüst oldatot tartalmazó 3 literes medencékbe, illetve kontroll medencékbe. A vizsgálat 5 hétig tartott, 2 ismétlésben, félstatikus rendszerben. A kísérletben csak egészséges, a fajra jellemző fenotípusos tulajdonságokat jól mutató, teljesen kifejlett nőtényeket választottunk. Az oldatokat heti kétszer cseréltük. A kontroll egyedeket „rendszer vízben” tartottuk, amit egy időben cseréltünk frissre az oldatokkal. Az optimális oxigéntartalom fenntartását habkő segítségével, levegőztető berendezéssel oldottuk meg. Takarmányozásuk megegyezett a fent leírtakkal.

3.4.2.3 A kísérleti állomány szaporítása

A kísérlet megkezdése előtti napon, valamint utána hetente, a zebradánió szülőpárokat tiszta „rendszer vízbe”, szaporító edényekbe helyeztük 2 nőtény – 2 hím elrendezésben, a párok itt töltötték az éjszakát egymástól elválasztva. Másnap reggel került sor a hímek és nőtények összeengedésére, ezután történt meg az ívás. A szülők eltávolítása után, a nőtények visszakerültek a nanoezüst oldatba, a hímek az eredeti medencéjükbe.

3.4.3 Anyai hatás vizsgálatára irányuló kísérletek

A szaporítómedencékből az ikrákat összegyűjtöttük, majd az ikrákat megszámoltuk és 27,5 °C-os inkubátorba helyeztük. Másnap megtörtént a termékenyülési arány meghatározása, a

terméketlen ikraszemek eltávolítása és a „rendszer víz” cseréje. Minden héten 200 db embriót választottunk ki véletlenszerűen, koncentrációnként, majd fénymikroszkóp segítségével értékeltük őket. Az ötödik héten az ívás után a nőtények hasát felmetszettük és 8%-os pufferolt formalinnal töltött felcímkézett szövettani kazettákba helyeztük, szövettani vizsgálatok céljából.

A következők szerint vizsgáltuk az ikrákat:

- o Ikrák száma
- o Termékenyülési arány

Az embriók morfológiai értékelése a következők szerint történt:

- o A farok és a szik elválása
- o Szívműködés vizsgálata
- o Test alakja
- o Sziködéma
- o Fejletlen/torz egyedek
- o Szomiták hiánya
- o Torz szomiták

3.5 Szövettani vizsgálatok

A vizsgálat végén a halakat szegfűszegolajos vízben túllattuk, illetve hasukat felmetszettük és 8%-os pufferolt formalinnal töltött felcímkézett szövettani kazettákba helyeztük, szövettani vizsgálatok céljából. A szövettani beágyazásig formalinban tartósítottuk a mintákat. A kazettákat az oldat teljesen belepte.

A mintákat tartalmazó kazettákat behelyeztük a dehidratáló automatába, mely előre beállított programon viszi végig a mintákat. Ez a folyamat 10-12 órába telik, a mintákat ezután minél hamarabb be kell ágyazni, ami a következő napon meg is történt. Paraffinos beágyazást alkalmaztunk.

A víztelenítés és a paraffinnal való átítás után a minták vágása könnyen elvégezhető. Ezután mikrotómmal elkészítettük a metszeteket. A lemetszett mintákat tárgylemezen rögzítettük. A festés végeztével fedőlemezzel fedtük le a mintákat.

A metszeteket mikroszkóp alatt vizsgáltuk, és fényképeket készítettünk róluk.

3.5.1 A PAS-festés menete: (töbllépcsős küvettasorozat)

1. Két különböző küvettában 10-10 percig xilolos áztatást alkalmaztunk (deparaffinálás).

2. Ezután előbb 96%-os alkoholba, majd 70 %-os alkoholba áztattuk be a metszeteket szintén 10-10 percig (xilol eltávolítása).
3. Többszöri desztillált vizes atmoszással eltávolítottuk az alkoholt.
4. 10 percig oxidáltuk perjósavval.
5. Alapos desztillált vizes kimosást alkalmaztunk, többszöri cserével, az utolsó 5 percig állni hagytuk.
6. 10 percig Schiff-reagenssel kezeltük.
7. A kénsavas vizes (bűdösvíz) öblítés során kétszer cseréltünk oldatot és a másodikban 7-10 percig hagytuk állni a mintákat.
8. Folyó csapvíz alatt kiöblítettük a mintákat körülbelül 10 percig.
9. Ezután hematoxin oldatba helyeztük a tárgylemezeket maximum 25 másodpercig (magfestés).
10. Majd folyó csapvíz alá tartottuk 10 percig a magfestés fokozása érdekében (kékítés).
11. Ezután előbb 70%-os, majd 96%-os alkoholba áztattuk a metszeteket 5-5 percig (víztelenítés).
12. Végül xilolos áztatást alkalmaztunk két fokozatban 5-5 percig (felderítés).

3.6 Az ikrahéj barrier hatásának vizsgálata

3.6.1 Transzgenikus zebradanió embriók nyérése

A szaporításra szánt transzgenikus zebradaniók tartási, takarmányozási és szaporítási körülményei megegyeznek a fent leírtakkal.

3.6.2 Az embriók és egyes szervek fejlődési rendellenességeinek vizsgálata

A kísérlet során 100 ppm-es törzsoldatot a fent leírtakkal azonos eljárással készítettük, majd ennek segítségével kialakítottuk a vizsgálatra választott 5 ppm, 10 ppm, 20 ppm-, 50 ppm és 100 ppm-es nanoezüst koncentrációkat. A kísérlet 72 órán át, 3 ismétlésben zajlott.

A szülők eltávolítása után az ikrákat összegyűjtöttük, majd átlagosan az ikrák felét egy-egy 10 cm-es Petri-csészébe helyeztük az adott koncentrációjú nanoezüst oldatba. Az ikrák másik felét enzimes „héjazásnak” vetettük alá, majd az előző nap elkészített vékony agar réteggel ellátott 10 cm-es Petri-csészébe helyeztük az adott koncentrációjú nanoezüst oldatba. Kontroll csoportot is beállítottunk, mind a héjazott, mind az ikrahéjjal rendelkező ikrák esetében, szintén három ismétlésben. A héjazott csoportokban a túlélést 24 óránként ellenőriztük, majd 72 óra elteltével minden csoportban meghatároztuk a kelési arányt. A kezelés végén fénymikroszkóppal vizsgáltuk az embriók morfológiai elváltozásait, fluoreszcens mikroszkóppal pedig az adott fluoreszcensen jelölt szervben fellépő esetleges torzulásokat.

3.6.2.1 Az ikrák enzimes héjazásának menete:

1. Pronase készítése:
 - a. Összetevők:
 1. 50 ml Hank's oldat
 2. 500 mg Pronase
 - b. Az összetevőket 30 percig 37 C-os vízfürdőbe helyezzük , majd Eppendorf csőbe adagoljuk (500 µl/ Eppendorf cső)
 - c. Felhasználásig lefagyasztva tároljuk, közvetlenül használat előtt olvasszuk fel
2. Helyezzünk maximum 150-200 db embriót egy 5 cm-es agar nélküli Petri-csészébe, kevés „rendszer vízzel”, de az ikrákat lepje el.
3. Adjunk hozzá egy Eppendorf pronase-t, majd mikroszkóp alatt figyeljük meg, mikor kezdenek el kibújni az embriók az ikrahéjból (ha nagyon lassú az emésztés, adhatunk hozzá még egy Eppendorf pronase-t).
4. Miután az első 3-5 db embrió már elkezd kibújni, öntsük az embriókat egy főzőpohárba, melybe előzőleg „rendszer vizet” töltöttünk (min. 0,5 l). Ezzel megakadályozzuk, hogy az enzim kárt tegyen az embriókban.
5. Kétszer megismételjük az átmosást, nagyon ügyelve arra, hogy mikor leöntjük a vizet az embriókról, az embriók felszíne ne érintkezzen levegővel.
6. A harmadik átmosás után agarral bélelt Petri-csészékbe helyezzük az embriókat. A Petri-csészéket 27,5 C-os inkubátorba helyezzük.

3.6.2.2 Az agarral bélelt Petri-csészék elkészítésének menete:

1. 1%-os agar-agar gél összetevői:
 - a. Agar – agar: 1,5 g
 - b. Reverzvíz: 150 ml
2. Először a szilárd alkotót mérjük be, majd hozzáadjuk a vizet
3. Fokozatos melegítés során feloldjuk az agar-agart
4. Ha a táptalaj teljesen átlátszóvá vált, hűtjük, majd, 0,5-1 cm magasan steril petricsészékbe öntjük
5. Az embriókat a kihűlt Petri-csészékbe helyezzük, miután adott koncentrációjú nanoezüst oldatot öntöttünk bele

3.6.2.3 A lárvák morfológiai vizsgálata:

- o test alakja
- o sziködéma

- o fejletlenség
- o rendellenes szik
- o torz farok
- o torz szomiták

3.6.2.4 Az adott fluoreszcensen jelölt szervben fellépő torzulások vizsgálata

- o Idegrendszer/ idegsejtek vizsgálat
- o Vértépző szervek és az érrendszer vizsgálata
- o Vese fejlődése

3.7 Alkalmazott statisztikai módszerek

A vizsgálatok eredményeit SPSS 13.0 for Windows programmal értékeltük ki. Az anyai hatás vizsgálata során az ikraszám, termékenyülési arány, valamint az ikrahéj barrier hatására irányuló vizsgálatok során a túlélés vizsgálatokor egyszempontú variancia-analízist használtunk (ANOVA, $p < 0,05$), a homogenitás-vizsgálat (Test of Homogeneity) eredményétől függően Tukey HSD, illetve Dunnett's T3 tesztet alkalmaztunk. Az ikrahéj barrier hatásának vizsgálata során fellépett morfológiai elváltozásokat χ^2 teszt segítségével értékeltük ($p < 0,05$).

4 Vizsgálati eredmények és megvitatásuk

4.1 Anyai hatás vizsgálat

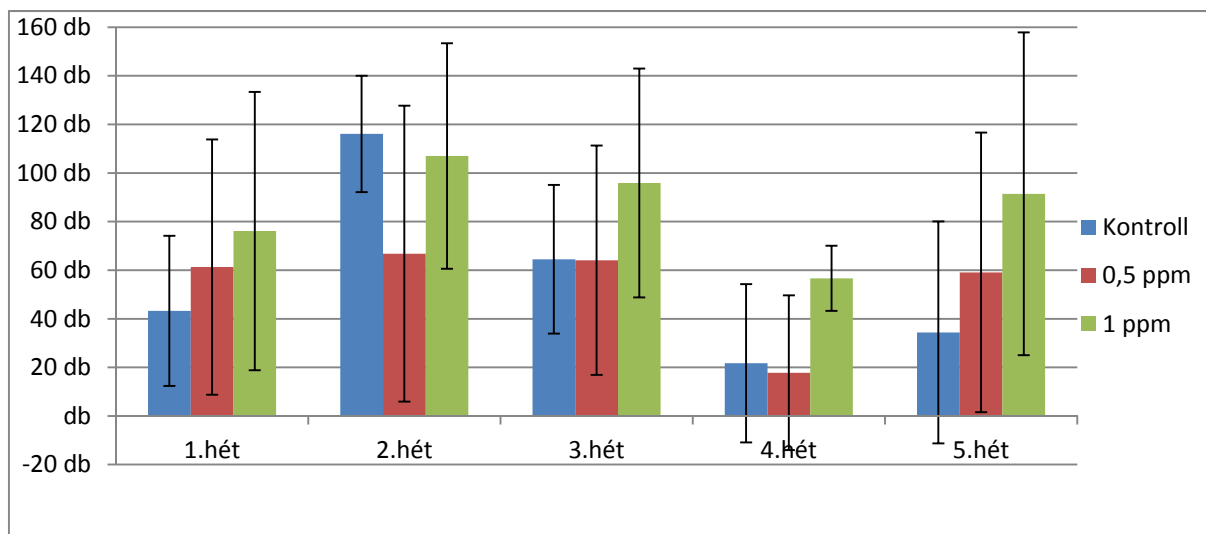
Az anyai hatás vizsgálat során 5 héten keresztül tartottunk 0,5 ppm és 1 ppm koncentrációjú nanoezüst oldatban a zebrafish nőtényeket, félstatikus rendszerben. A nőtények hetente ívtak, az így nyert ikrák számát, termékenyülési arányát értékeltük, valamint a fejlődő embriók morfológiai elváltozásait elemeztük.

4.2 Anyai hatás vizsgálat – ikrák száma és termékenyülési arány értékelése

A nőtények által lerakott ikrák számának, valamint a termékenyült ikraszemek arányának összehasonlítására egyszempontú variancia-analízist (ANOVA) alkalmaztunk. Teszteltük a varianciák homogenitását, majd az eredmény tükrében választottuk ki az alkalmazandó post hoc tesztet. Az ikraszámok vizsgálata során a varianciák homogének voltak ($p = 0,152$), így ebben az esetben Tukey HSD post hoc tesztet használtunk. A termékenyülések összehasonlításakor szignifikáns eltérést kaptunk a homogenitás vizsgálatokor ($p = 0,002$), ezért ebben az esetben Dunnett's T3 post hoc tesztet alkalmaztunk.

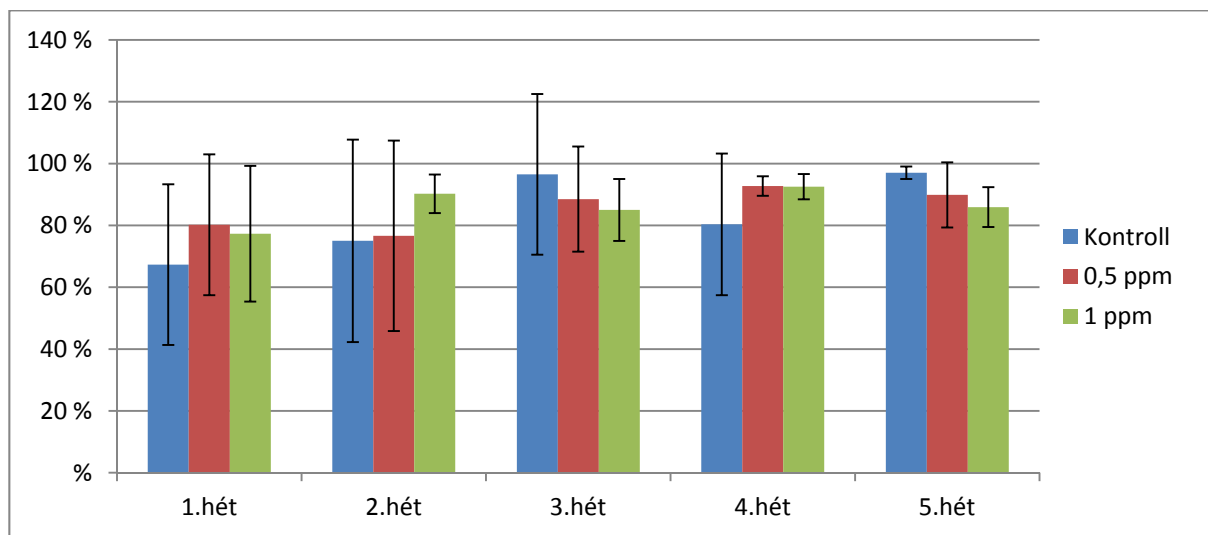
Az ikraszám változásának vizsgálata során nem találtunk szignifikáns eltérést a kontrollhoz képest az adott heteken belül, valamint időfüggő hatást sem tudtunk megállapítani. Minden

csoportban nagy szórást tapasztaltunk, még a kontrollban is (4. ábra). Annak ellenére, hogy szignifikáns különbséget nem találtunk a csoportok között, az idő előrehaladtával minden csoportban azonos trend volt megfigyelhető az ikraszámot illetően.



4. ábra: Ikraszám változása

A kísérlet során megállapított termékenyülési arányok értékei az 5. ábrán láthatók. A termékenyülési arány változásának vizsgálata során nem találtunk szignifikáns eltérést a csoportok között, valamint időfüggő hatást sem tudtunk megállapítani. Szintén minden csoportban nagy szórást tapasztaltunk, beleértve a kontroll csoportot is.



5. ábra: Termékenyülés változása

4.3 Az embriók morfológiai értékelésének eredményei

A hetek során 200 db embriót választottunk ki véletlenszerűen, koncentrációnként, majd fénymikroszkóp segítségével értékeltük őket. A vizsgálat során nem tapasztaltunk olyan arányú és mértékű elváltozásokat, melyek jelentősen befolyásolhatnák a szaporodási sikert.

1. táblázat: A kontroll csoport morfológiai vizsgálatának eredményei

Kontroll	fejletlen (db)	fejletlen%	torz (db)	torz%	sziködéma (db)	sziködéma%
1 hét	1	0,5	1	0,5	0	0
2. hét	1	0,5	0	0	0	0
3. hét	2	1	1	0,5	0	0
4. hét	0	0	0	0	0	0
5. hét	0	0	0	0	1	0,5

A kontroll csoport eredményei az 1. táblázatban láthatók. A kontroll csoportban az első és második héten egy-egy fejletlen embriót találtunk, melyekre jellemző, hogy még nem vált el a farok a sziktól, még nem alakultak ki a szomiták és a szívverés se indult el. Az első héten egy torz egyedet is feljegyeztünk. A harmadik héten két embrió esetében tapasztaltunk fejletlenséget, valamint egy torz egyedet jegyeztünk fel. A negyedik héten nem találtunk morfológiai elváltozást az embriók vizsgálata során. Az ötödik héten egy embrió esetében figyeltük meg sziködéma kialakulását.

2. táblázat: A 0,5 ppm csoport morfológiai vizsgálatának eredményei

0,5 ppm	fejletlen (db)	fejletlen %	torz (db)	torz %	sziködéma (db)	sziködéma %
1 hét	0	0	0	0	0	0
2. hét	0	0	2	1	0	0
3. hét	3	1,5	3	1,5	0	0
4. hét	0	0	0	0	0	0
5. hét	0	0	0	0	4	2

Az első és a negyedik héten a 0,5 ppm-es csoportban nem találtunk morfológiai rendellenességet, míg a második héten két torz egyedet figyeltünk meg. A harmadik héten három embrió esetében tapasztaltunk fejletlenséget, és három torz egyedet állapítottunk, valamint az ötödik héten négy esetében figyeltünk meg sziködéma kialakulását. A 0,5 ppm-es csoport eredményei az 2. táblázatban láthatók.

3. táblázat: Az 1 ppm csoport morfológiai vizsgálatának eredményei

1 ppm	fejletlen (db)	fejletlen %	torz (db)	torz %	sziködéma (db)	sziködéma %
1 hét	1	0,5	1	0,5	0	0
2. hét	1	0,5	1	0,5	0	0
3. hét	1	0,5	0	0	0	0
4. hét	1	0,5	0	0	2	0
5. hét	6	3	0	0	8	4

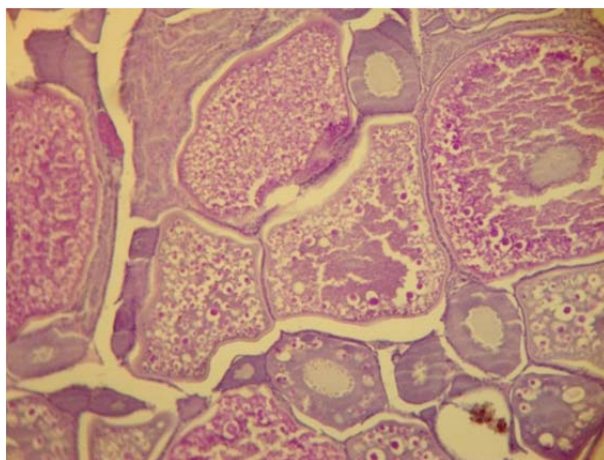
Az 1 ppm-es csoportban (3. táblázat) az első és a második héten egy-egy embrió esetében tapasztaltunk, fejletlenséget és egy-egy torz egyedet jegyeztünk fel. A harmadik héten egy fejletlen embriót találtunk. A negyedik héten két embrión figyeltünk meg sziködémát, valamint egy embrió esetében állapítottunk meg fejletlenséget. Az utolsó héten hat fejletlen egyedet jegyeztünk fel, melyeknél még nem alakultak ki a szomiták és a szívverés, valamint nyolc esetben figyeltünk meg sziködémát, melyekből kettő a fejletlen embriók közé esett.

4.4 Szövettani elemzés:

4.4.1 A kontroll csoport

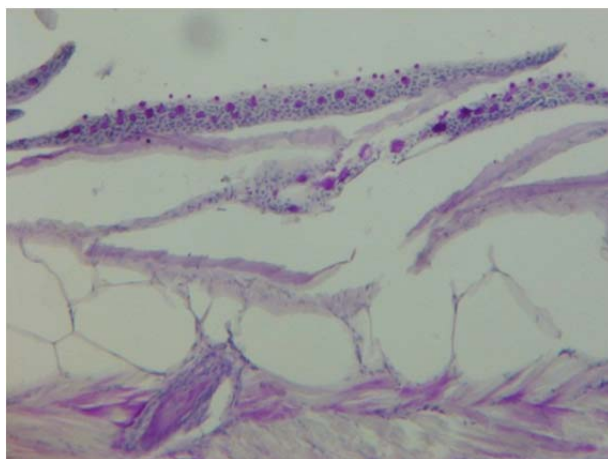
A kontroll csoport esetében valamennyi vizsgált szerv és szövet esetében a tankönyvekben leírt szövettani anatómiai állapotokat figyeltük meg. Részletesebben leírva:

A kontroll csoport halainak petefészkében a szöveti alaphálózaton *primaer* és *secundaer* ovociták figyelhetők meg a preovulációs érett petesejtek között. A savóshártya ép (6. ábra).



6. ábra: A kontroll csoport halainak petefészke (PAS, 420x)

A bőr többrétegű el nem szarusodó hámja közepes mennyiségű nyálkasejtet (kehelysejt) tartalmaz. A bőrt vékony nyálkaréteg fedi. Az irharéteg és a bőr alatti kötőszövet elváltozást nem mutat (7. ábra).



7. ábra: A kontroll csoport halai bőrének átmetszete (PAS, 420x)

A kopoltyúívek, a kopoltyúlemezek többrétegű el nem szarusodó hámja közepes mennyiségű nyálkasejtet (kehelysejt) tartalmaz. A chloridsejtek mennyisége normális. A légzőredők megformáltak, szabadon helyeződnek, összetapadás, hámproliferáció nem észlelhető (8. ábra).

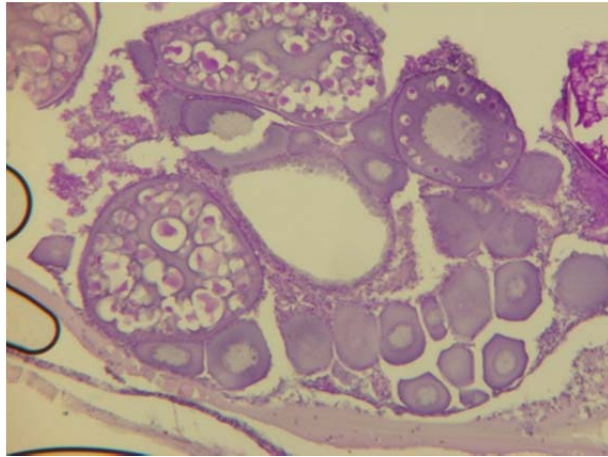


8. ábra: A kontroll csoport halainak kopoltyúja (PAS, 480x)

A májban élettani zsíros infiltráció volt megfigyelhető. A vese *hemopoetikus* részében élénk *erythrocytopoiesis* és *granulocytopoiesis* zajlik. A vese *exocrin* része – a *nephron* - elváltozást nem mutat. Az agyvelőben és a retinában kóros elváltozás nem látható. A *cornea* ép. A vázizomzat és a csontozat ép. A kopoltyú és a váz porcainál figyelhető meg az alapállomány felritkulása, a viszonylagos sejtgazdagság, ami enyhe C-vitaminhiányra utal.

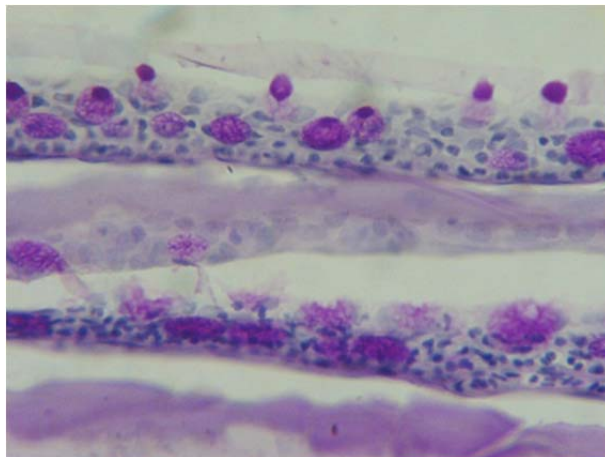
4.4.2 A 0.5 ppm-es nanoezüst csoport

A 0.5 ppm-es csoport halainak petefészkében a szöveti alaphálózaton *primaer* és *secundaer* ovociták figyelhetők meg a preovulációs érett petesejtek között. A savóshártya ép (9. ábra).



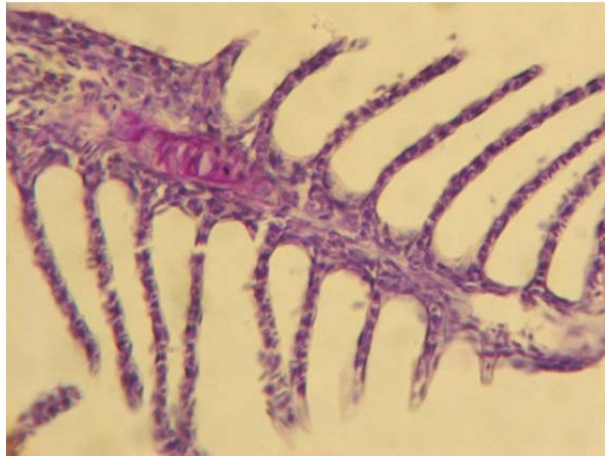
9. ábra: A 0.5 ppm csoport halainak petefészkében nem láthatók kórszövettani elváltozások (PAS, 420x)

A 0.5 ppm csoportban a halak bőrének többrétegű el nem szarusodó hámjában a kehelysejtek száma enyhén megsaporodott. A bőrt széles nyálkaréteg fedi. Az irharéteg és a bőr alatti kötőszövet elváltozást nem mutat (10. ábra).



10. ábra: A 0.5 ppm csoport halainak bőrében a kehelysejtek száma enyhén megsaporodott. A bőrt széles nyálkaréteg fedi (PAS, 420x)

A kopoltyúívek, a kopoltyúlemezek többrétegű el nem szarusodó támasztóhámjában a kehelysejtek száma megfogyott. A chloridsejtek mennyisége kevesebb a normálisnál. A légzőredők megformáltak, szabadon helyeződnek, összetapadás, hámproliferáció nem észlelhető (11. ábra).

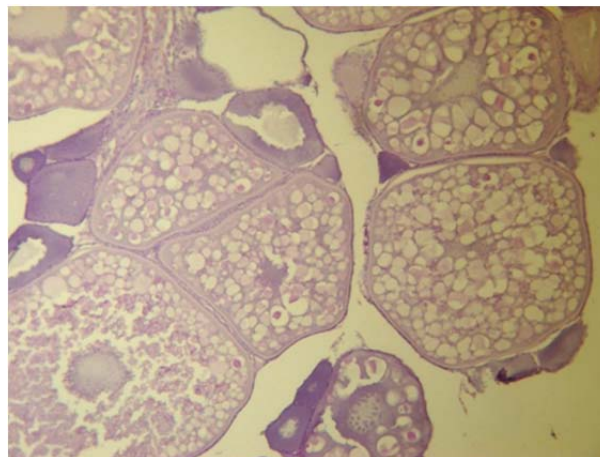


11. ábra: A 0.5 ppm csoport halai kopolyájának többrétegű támasztóhámjában a kehelysejtek száma megfogyott. A redők szerkezete ép. A hámproliferáció nem figyelhető meg. (PAS, 420x)

A májban élettani zsíros infiltráció volt megfigyelhető. A vese *hemopoetikus* részében élénk *erythrocytopoiesis* és *granulocytopoiesis* zajlik. A vese *exocrin* része – a *nephron* - elváltozást nem mutat. Az agyvelőben és a retinában kóros elváltozás nem látható. A cornea ép. A vázizomzat és a csontozat ép. A kopolya és a váz porcainál figyelhető meg az alapállomány felritkulása, a viszonylagos sejtgazdagság, ami enyhe C-vitaminhiányra utal.

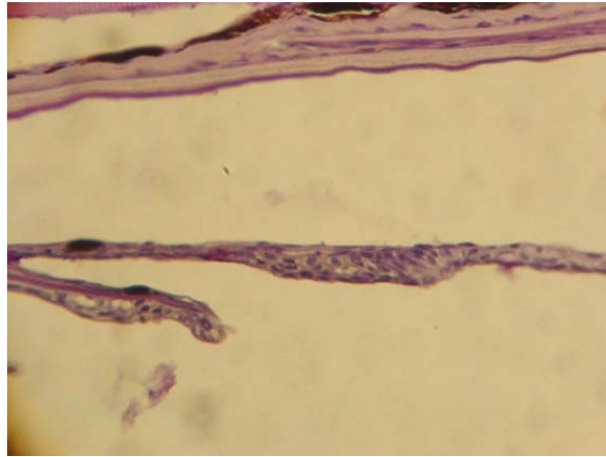
4.4.3 Az 1 ppm-es nanoezüst csoport

Az 1 ppm-es nanoezüst csoport halainak petefészkében a szöveti alaphálózaton *primaer* és *secundaer* ovociták figyelhetők meg a preovulációs érett petesejtek között. A savóshártya ép (12. ábra).



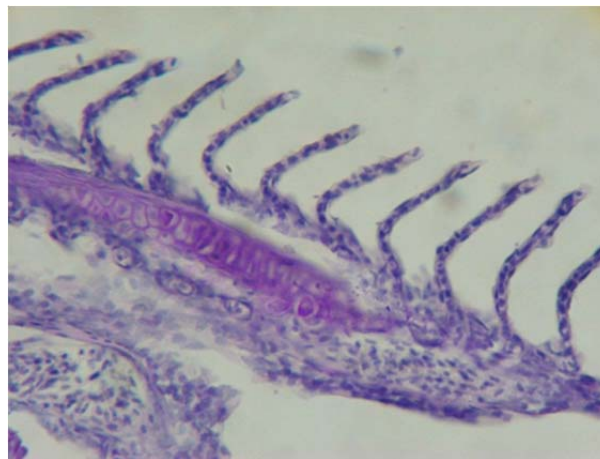
12. ábra: Az 1 ppm-es csoport halainak petefészkében nem láthatók kórszövettani elváltozások (PAS, 420x)

Az 1 ppm csoport halai bőrének többrétegű el nem szarusodó hámjában a kehelysejtek száma erősen megfogyott, helyenként eltűntek a hámból. A bőrt nem fedi nyálkaréteg. Az irharéteg és a bőr alatti kötőszövet elváltozást nem mutat (13. ábra).



13. ábra: Az 1 ppm-es csoport halainak bőrében nem láthatók kehelysejtek. A bőrt nem fedi nyálkaréteg.
(PAS, 420x)

A kopoltyúívek, a kopoltyúlemezek többrétegű el nem szarusodó támasztóhámjában a kehelysejtek nem láthatók. A chloridsejtek mennyisége erősen megfogyott. A légzőredők megformáltak, szabadon helyeződnek, összetapadás, hámproliferáció nem észlelhető (14. ábra).



14. ábra: Az 1 ppm-es csoport halai kopoltyújának többrétegű támasztóhámjában a kehelysejtek nem láthatók. A redők szerkezete ép. Az el nem szarusodó laphámiban hyperplasia nem figyelhető meg.
(PAS, 420x)

A májban élettani zsíros infiltráció volt megfigyelhető. A vese *hemopoetikus* részében élénk *erythrocytopoesis* és *garnulocytopoesis* zajlik. A vese *exocrin* része – a *nephron* - elváltozást nem mutat. Az agyvelőben és a retinában kóros elváltozás nem látható. A *cornea* ép. A vázizomzat és a csontozat ép. A kopoltyú és a váz porcainál figyelhető meg az alapállomány felritkulása, a viszonylagos sejtgazdagság, ami enyhe C-vitaminhiányra utal.

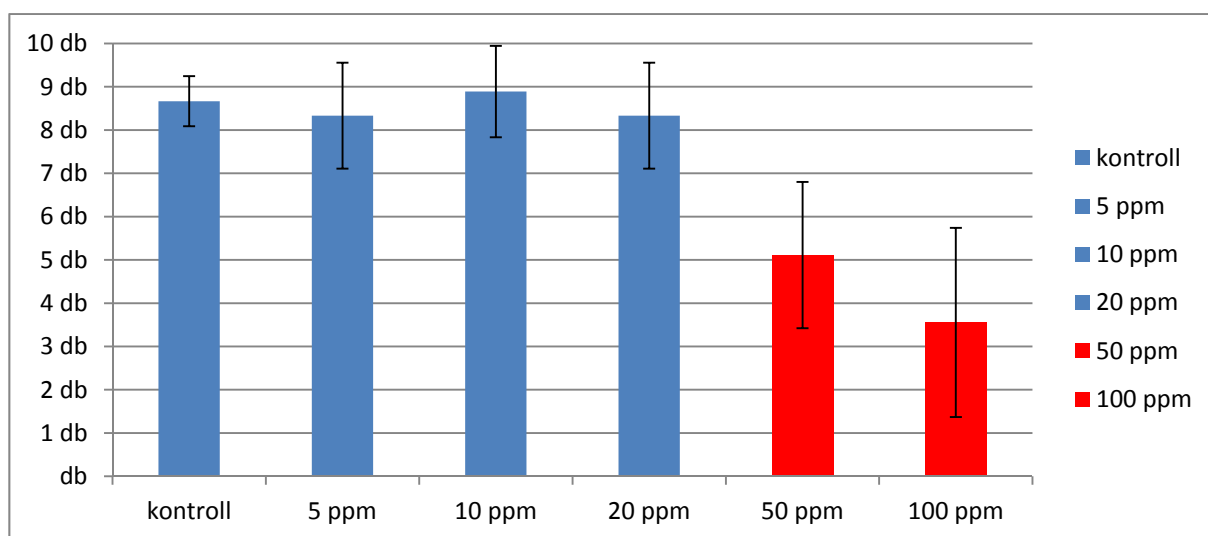
4.5 A nanoezüst hatása a fejlődő embriókra, és az ikrahéj barrier hatásának vizsgálata

A kísérlet során vese, idegrendszer és vér-vérér transzgenikus zebradániók héjazott és héjazatlan ikráit kezeltük 5, 10, 20, 50 és 100 ppm-es nanoezüsttel, a kísérlet három ismétlésben zajlott. A túlélést 24 óránként ellenőriztük a héjazott ikrák esetében és a kontroll csoportokban. 72 óra után minden csoportban meghatároztuk a túlélést, valamint fénymikroszkóppal vizsgáltuk az embriók morfológiai elváltozásait, fluoreszcens mikroszkóppal pedig az adott fluoreszcensen jelölt szervben fellépő esetleges torzulásokat.

A vizsgálat során a csoportokban a túlélések összehasonlítására egyszempontú varianciaanalízist alkalmaztunk (ANOVA). Teszteltük a varianciák homogenitását, majd az eredmény tükrében választottuk ki az alkalmazandó post hoc tesztet. Amennyiben a vizsgálata során a varianciák homogének voltak ($p > 0,05$), akkor ebben az esetben Tukey HSD post hoc tesztet alkalmaztunk. Ha az összehasonlításakor szignifikáns eltérést kaptunk a homogenitás vizsgálatakor ($p < 0,05$), Dunnett's T3 post hoc tesztet alkalmaztunk. χ^2 segítségével páronként hasonlítottuk össze a különböző morfológiai rendellenességeket a héjazott és a héjazatlan csoportokban ($p < 0,05$).

4.5.1 A héjas embriók túlélése

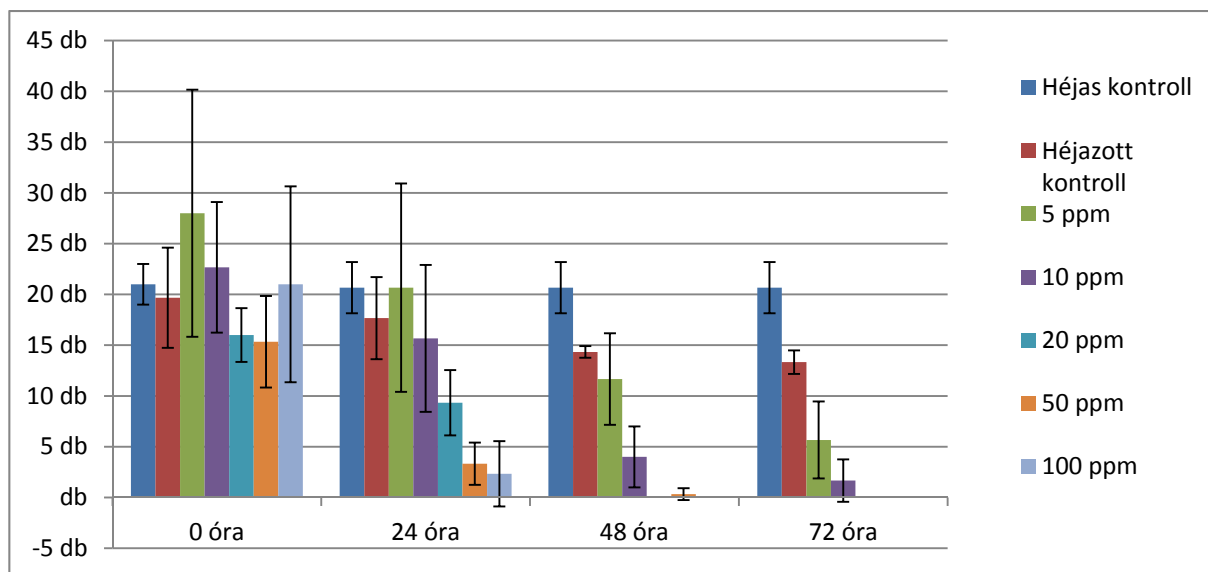
Az 15. ábrán a héjas embriók túlélése látható. Az összehasonlítás során Tukey HSD próbát alkalmaztunk (homogenitás $p=0,056$). Az 50 ppm-es és a 100 ppm-es csoport esetében szignifikánsan magasabb elhullást tapasztaltunk a többi csoporthoz képest, azonban ezen két csoport között nem találtunk szignifikáns különbséget.



15. ábra: A héjas embriók túlélése 72 óra után

4.5.2 A héjazott embriók túlélése

Az embriók túlélése a héjazott csoportokban, héjazott, illetve héjas kontrollban a 16. ábrán látható.



16. ábra: Az embriók túlélése a 72 óra alatt

Az egyes csoportok időbeni összehasonlítása, valamint az egyes idők összehasonlítása a kezelések között egyszempontú variancia-analízissal (ANOVA) történt. Teszteltük a varianciák homogenitását, majd az eredmény tükrében választottuk ki az alkalmazandó post hoc tesztet. A vizsgálat során a varianciák nem voltak homogének ($p=0,000$), így Dunnett's T3 post hoc tesztet alkalmaztunk.

4.5.2.1 Az vizsgált idők közötti összehasonlítások eredményei:

A héjas és a héjazott kontroll, valamint a 100 ppm-es csoport esetén nem találtunk szignifikáns különbséget a 0, 24, 48 és 72. óra során a túlélő embriók összehasonlítása során.

Az 5 ppm-es csoportban a 0. órában szignifikánsan magasabb arányú túlélést állapítottunk meg a 72. órában túlélő egyedekhez viszonyítva.

A 10 ppm-es és 20 ppm-es csoport esetében a 0. órában túlélő embriók száma szignifikánsan magasabb volt, mint a 48. óra és a 72. órában túlélő egyedek száma, valamint a 10 ppm-es csoportban a 24. óra és a 72. óra között szintén szignifikáns különbséget állapítottunk meg.

Az 50 ppm-es csoportban a 0. órában szignifikánsan magasabb volt az élő embriók száma a többi csoporttal összehasonlítva. A többi csoport között nem találtunk szignifikáns különbséget.

4.5.2.2 A vizsgált kezelések közötti összehasonlítások eredményei:

A 0. órában nem találtunk szignifikáns különbséget a csoportok között.

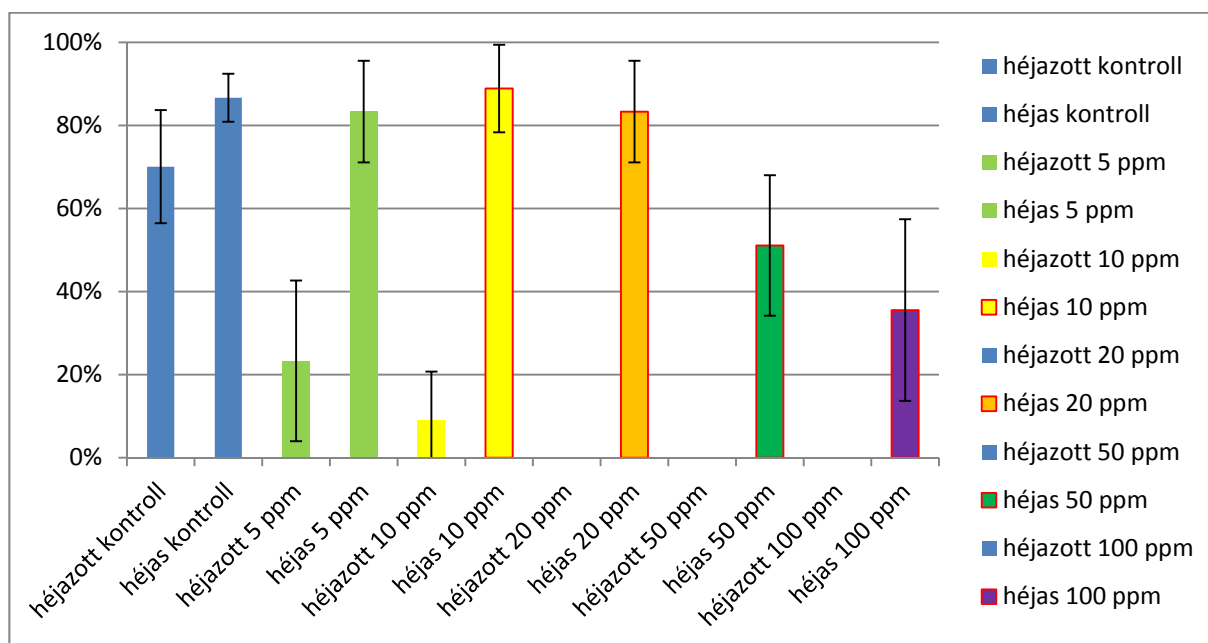
A 24. órában a héjas kontrollban túlélő embriók száma szignifikánsan magasabb volt az 50 ppm-es és a 100 ppm-es csoportban túlélő embriók számától.

A 48. órában az 5ppm-es csoport nem különbözik szignifikánsan a többi csoporttól. A 10 ppm-es csoportban szignifikánsan alacsonyabb az embriók túlélése a héjas kontrollal összehasonlítva, míg a 20, 50, 100 ppm-es csoportban a túlélő egyedek száma a héjas és a héjazott kontrollban túlélő embriók számától is szignifikánsan különbözik.

A 72. órában az 5 ppm-es csoport nem különbözik szignifikánsan a többi csoporttól. A héjas és héjazott kontrollban szignifikánsan magasabb a túlélést tapasztaltunk a 10, 20, 50 és 100 ppm-es csoporttal összehasonlítva.

4.5.3 Az ikrahéj barrier hatásának vizsgálata

A 17. ábrán a héjas és a héjazott embriók túlélése látható 72 óra eltelte után. A vizsgálat során a héjas és héjazott embriók túlélésének arányait hasonlítottuk össze páronként, Dunnett's T3 teszt segítségével (homogenitás $p=0,000$). Megállapítottuk, hogy a kontroll, valamint az 5 ppm-es nanoezüst koncentrációk esetében nincs szignifikáns különbség a héjazott és héjazatlan csoportok között, azonban a 10, 20, 50 és 100 ppm-es koncentrációk esetében a szignifikánsan megemelkedett a mortalitás a héjazott csoportokban.



17. ábra: A héjasok és a héjazott embriók túlélése a 72 óra után

4.6 Az embriók morfológiai értékelése

4.6.1 Morfológiai rendellenességek vizsgálata a héjas és a héjazott csoportokban

χ^2 segítségével hasonlítottuk össze a különböző morfológiai rendellenességek arányát a héjas csoportokban, 72 óra elteltével. A vizsgálat során megállapítottuk, hogy az 50 ppm-es és 100 ppm-es csoportok szignifikánsan eltérnek a kontrolltól a torz egyedek tekintetében, azonban dózisfüggést nem tudtunk megállapítani. A 100 ppm-es csoport esetén az egyéb torzulások (rendellenes szik, pigment) tekintetében is szignifikáns különbséget állapítottunk meg a kontrollhoz viszonyítva.

A héjazott csoportokban szintén χ^2 segítségével hasonlítottuk össze a különböző morfológiai rendellenességek arányát 72 óra után (kontroll, 5 és 10 ppm-es csoportok). A torz egyedek esetében a kontroll csoporthoz viszonyítva szignifikánsan eltér az 5 ppm-es és a 10 ppm-es csoport is, azonban a két csoport között nem találtunk szignifikáns különbséget. A sziködéma előfordulásának vizsgálata során a 10 ppm-es csoportban szignifikánsan több egyedet találtunk, mint 5 ppm-es csoportban, és szintén mindkét csoport szignifikánsan eltér a kontroll csoporttól. A torz farok vizsgálata során a héjazott kontroll, 5 ppm és 10 ppm csoportok között találtunk szignifikáns különbséget, azonban dózisfüggést nem tudtunk megállapítani. A torz szomiták vizsgálata során nem találtunk szignifikáns különbséget az 5 és 10 ppm-es csoportok között, azonban a kontroll csoportoktól szignifikánsan eltérnek. Az egyéb torzulások (pigment, torz szik) esetén szignifikánsan több egyedet állapítottunk meg a 10 ppm-es csoportban, az 5 ppm-es csoporthoz képest, a kontroll csoporttól mindkét csoport szignifikánsan eltér.

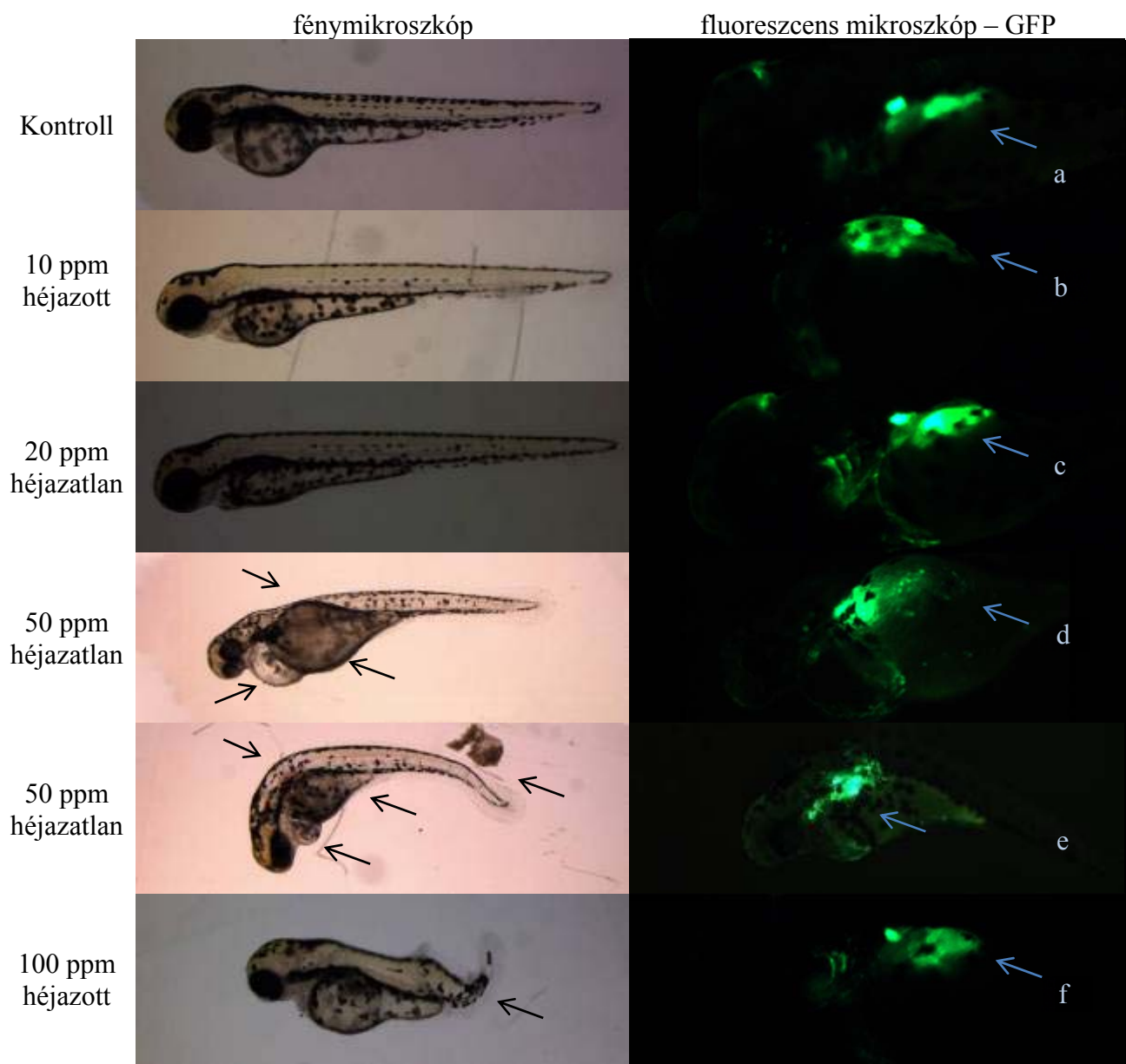
4.6.2 Az embriók fluoreszcensen jelölt szervben fellépő rendellenességek értékelése

A kísérlet során vese, idegrendszer és vér-vérér transzgenikus zebradániók héjazott és héjazatlan ikráit kezeltük 5, 10, 20, 50 és 100 ppm-es nanoezüsttel. 72 óra után fénymikroszkóppal vizsgáltuk az embriók morfológiai elváltozásait, fluoreszcens mikroszkóppal pedig az adott fluoreszcensen jelölt szervben fellépő torzulásokat.

4.6.2.1 A nano-ezüst hatásai a vese fejlődésére.

Az 5, 10, 20, 50 és 100 ppm nanoezüsttel kezelt vese transzgenikus lárvák képei a 18. ábrán láthatók. A vizsgálat során megállapítottuk, hogy a nanoezüst negatívan befolyásolja a vese fejlődését. A héjazatlan embriók esetében alacsonyabb koncentrációk is torzulást okoznak a szerv fejlődésében, míg a héjazott embriók esetében kisebb mértékű elváltozásokat tapasztaltunk.

- a, Kontroll egyed: Normális morfológia. Megfelelő méretű és alakú vese.
- b, 10 ppm nanoezüst, héjazott csoport: Normál morfológia, kisebb megnagyobbodás és eltérés látható a vesén.
- c, 20 ppm nanoezüst, héjas csoport: normál morfológia. Megfelelő méretű és alakú vese.
- d, 50 ppm nanoezüst, héjas csoport: Torz test, sziködéma, szívödéma. A vese torz, megnagyobbodott.
- e, 50 ppm nanoezüst, héjas csoport: Torz test, torz farok, sziködéma, szívödéma. A vese torz, megnagyobbodott.
- f, 100 ppm nanoezüst, héjazott csoport: Torz test, torz farok, torz vese.

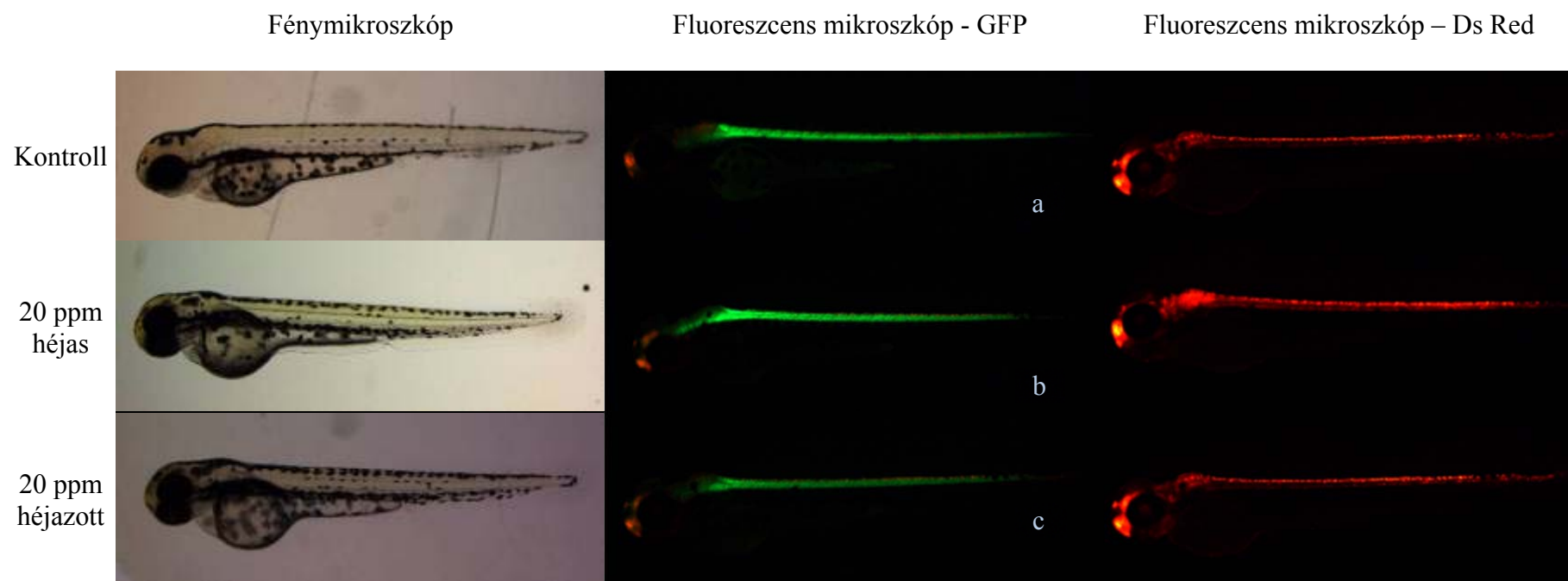


18. ábra: Vese transzgenikus embriók fénymikroszkópos és fluoreszcens képei.

4.6.2.2 A nanoezüst hatásai az idegrendszer fejlődésére.

Az 5, 10, 20, 50 és 100 ppm-es nanoezüsttel kezelt lárvák vizsgálata során nem állapítottunk meg torzulást, fejletlenséget vagy más elváltozást az idegrendszer fejlődésében a nanoezüst kitétettség hatására (19. ábra). Morfológiai rendellenességeket találtunk, azonban az idegrendszerben elváltozást nem állapítottunk meg.

- a, Kontroll egyed: Normális morfológia. Az idegrendszerben elváltozás nem látható
- b, 20 ppm nanoezüst, héjazott csoport: Normális morfológia. Az idegrendszerben elváltozás nem látható
- c, 20 ppm nanoezüst, héjas csoport: Normális morfológia. Az idegrendszerben elváltozás nem látható

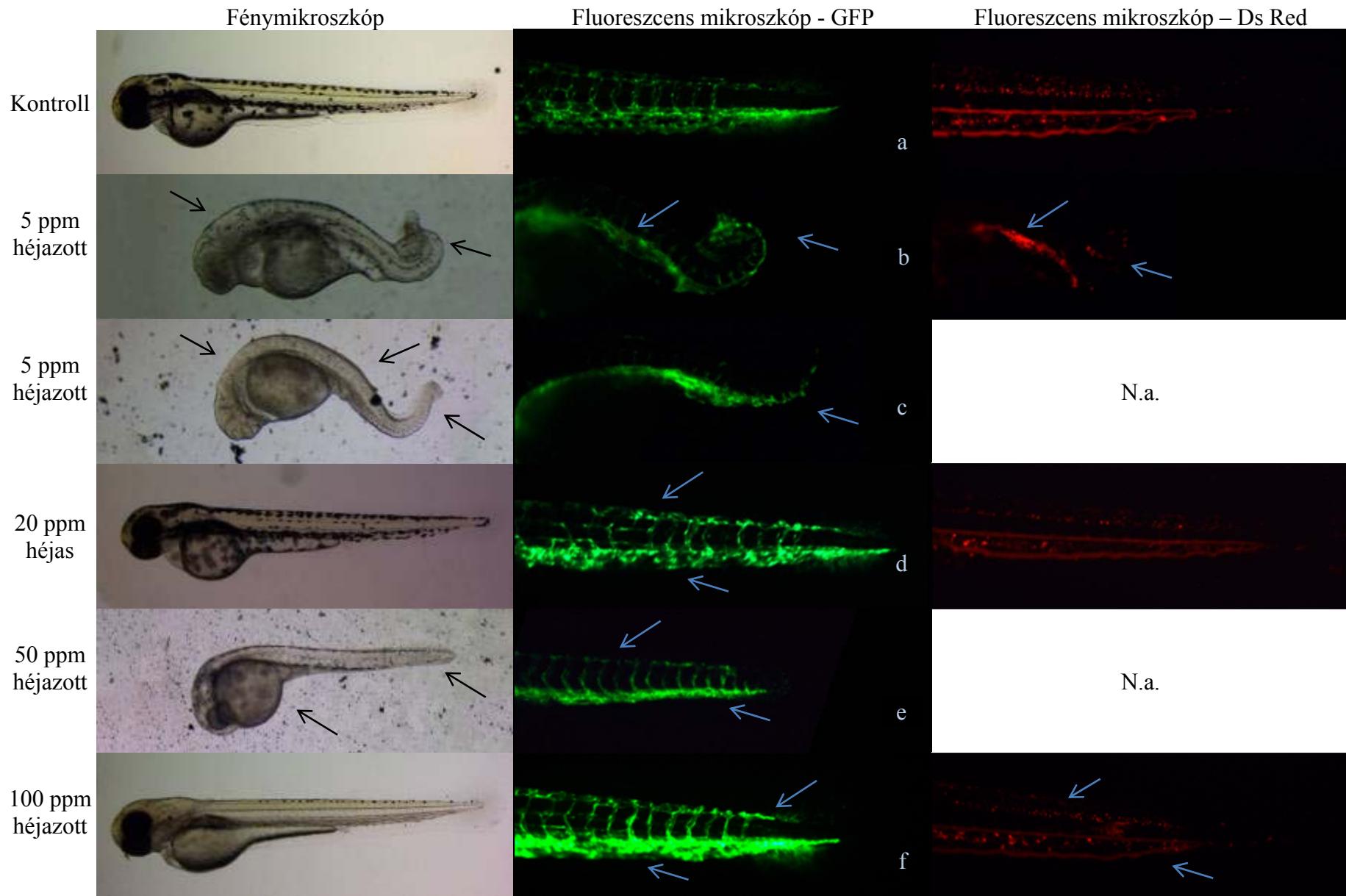


19. ábra: Idegrendszer transzgenikus embriók fénymikroszkópos és fluoreszcens képei.

4.6.2.3 A nanoezüst hatásai az érrendszer és vérképző szervek fejlődésére - farok

Az 5, 10, 20, 50 és 100 ppm nanoezüsttel kezelt vér-vérér transzgenikus lárvák farok részének képei a 20. ábrán láthatók. A vizsgálat során a nanoezüst negatív hatásait észleltük az vérképzőszervek és vérérrendszer fejlődésére. A héjazatlan embriók esetében alacsonyabb koncentrációk is torzulást okoznak az erek fejlődésében, míg a héjazott embriók esetében kisebb mértékű elváltozásokat tapasztaltunk.

- a, Kontroll egyed: Normális morfológia. Az érrendszerben elváltozás nem látható.
- b, 5 ppm nanoezüst héjazott csoport: Torz test, torz farok. Fejletlen érrendszer.
- c, 5 ppm nanoezüst héjazott csoport: Torz test, torz farok. Fejletlen érrendszer.
- d, 20 ppm nanoezüst, héjas csoport: Normális morfológia, kisebb mértékű elváltozás az érrendszerben.
- e, 50 ppm nanoezüst héjazott csoport: Fejletlen test, torz szik, kevésbé fejlett érrendszer.
- f, 100 ppm nanoezüst héjazott csoport: Normál morfológia, pigmentek hiánya, kisebb mértékű elváltozások az érrendszerben.

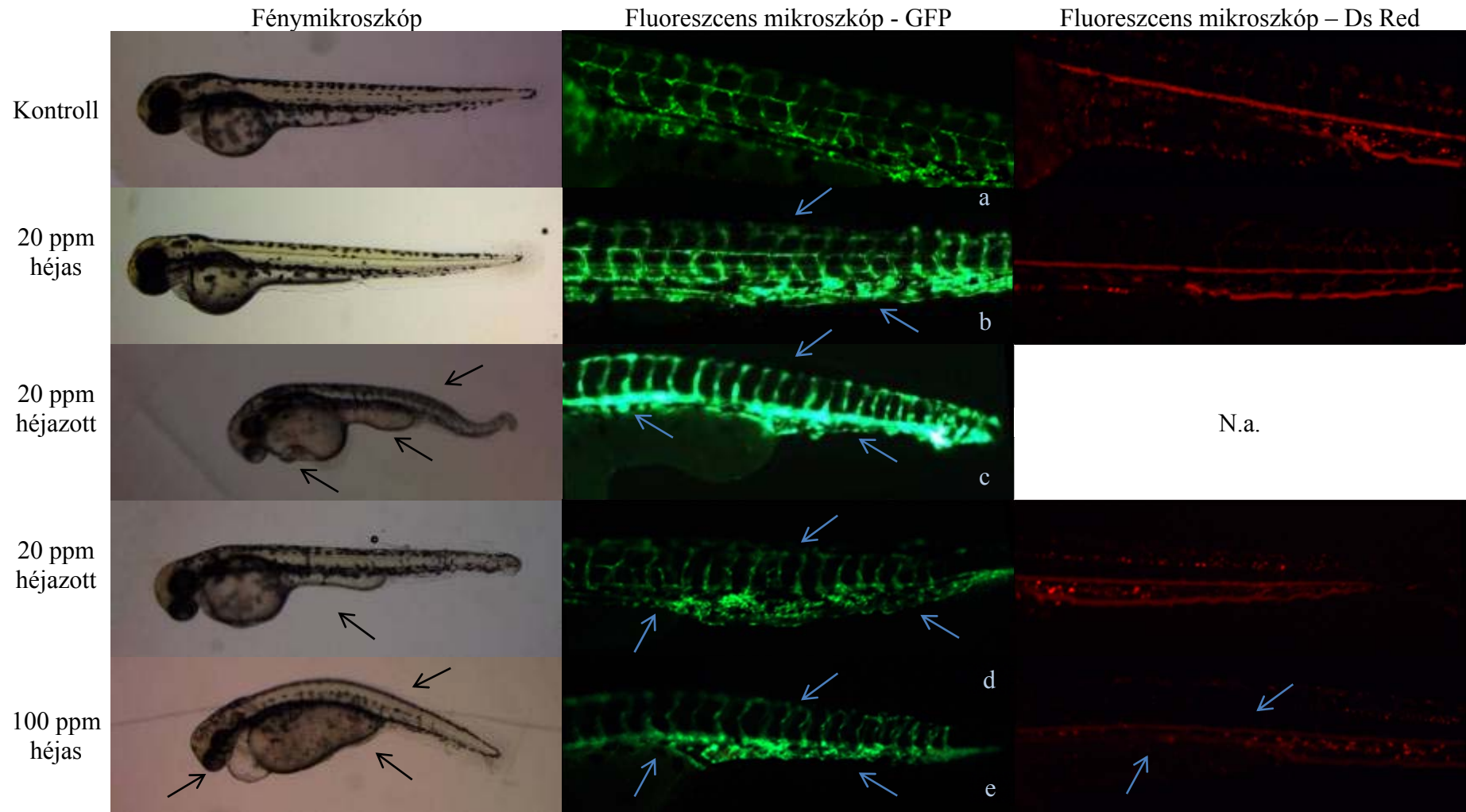


20. ábra: Vér-vérér transzgenikus embriók fénymikroszkópos és fluoreszcens képei - farok

4.6.2.4 A nanoezüst hatásai az érrendszer és vérképző szervek fejlődésére - törzs

Az 5, 10, 20, 50 és 100 ppm nanoezüsttel kezelt vér-vérér transzgenikus lárvák törzs részének képei a 21. ábrán láthatók. A vizsgálat során a nanoezüst negatív hatásait észleltük az vérképzőszervek és vérérrendszer fejlődésére. A héjazatlan embriók esetében alacsonyabb koncentrációk is torzulást okoznak az erek fejlődésében, míg a héjazott embriók esetében kisebb mértékű elváltozásokat tapasztaltunk.

- a, Kontroll egyed: Normális morfológia. Az érrendszerben elváltozás nem látható.
- b, 20 ppm nanoezüst, héjas csoport: Normális morfológia, az érrendszerben elváltozás nem látható.
- c, 20 ppm nanoezüst, héjazott csoport: Torz test, torz szik, torz farok, az érrendszerben nagyfokú elváltozás látható.
- d, 20 ppm nanoezüst, héjazott csoport: Torz test, torz farok, az érrendszerben nagyfokú elváltozás látható.
- e, 100 ppm nanoezüst, héjas csoport: Torz test, torz szik, szívödéma, az érrendszerben nagyfokú elváltozás látható.

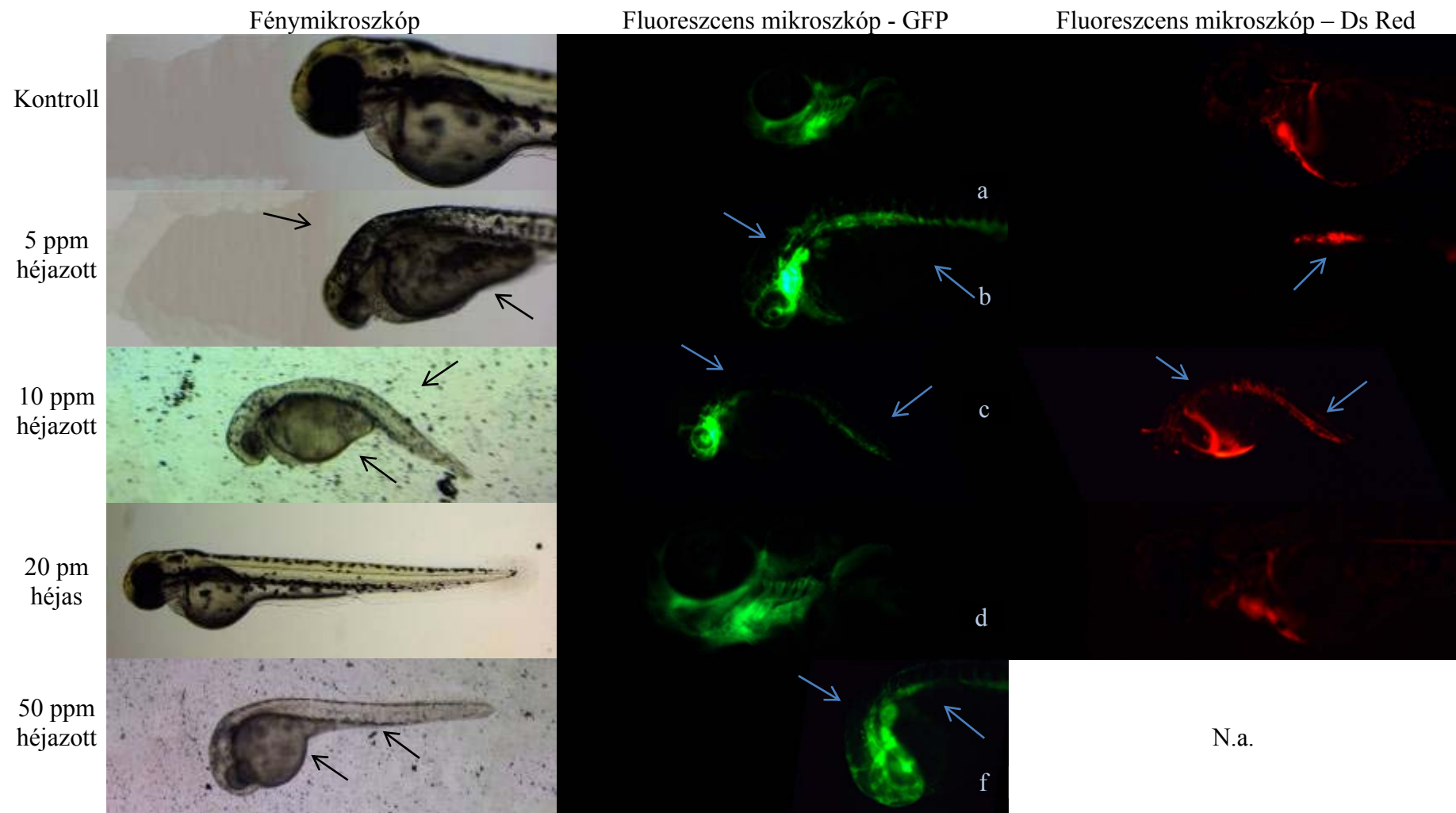


21. ábra: Vér-vérér transzgenikus embriók fénymikroszkópos és fluoreszcens képei – törzs

4.6.2.5 A nanoezüst hatásai az érrendszer és vérképző szervek fejlődésére - fej

Az 5, 10, 20, 50 és 100 ppm nanoezüsttel kezelt vér-vérér transzgenikus lárvák fej részének képei a 22. ábrán láthatók. A vizsgálat során a nanoezüst negatív hatásait észleltük az vérképzőszervek és vérérrendszer fejlődésére. A héjazatlan embriók esetében alacsonyabb koncentrációk is torzulást okoznak az erek fejlődésében, míg a héjazott embriók esetében kisebb mértékű elváltozásokat tapasztaltunk.

- a, Kontroll egyed: Normális morfológia. Az érrendszerben elváltozás nem látható.
- b, 5 ppm nanoezüst héjazott csoport: Torz test, torz szik, fejletlen érrendszer.
- c, 10 ppm nanoezüst héjazott csoport: Torz test, torz szik, az érrendszeren kisfokú elváltozás látható.
- d, 20 ppm nanoezüst, héjas csoport: Normális morfológia. Az érrendszerben elváltozás nem látható.
- e, 50 ppm nanoezüst, héjazott csoport: Fejletlen egyed, torz szik, az érrendszeren nagyfokú elváltozás nem látható.



22. ábra: Vér-vérér transzgenikus embriók fénymikroszkópos és fluoreszcens képei – fej

5 Hipotézisek megbeszélése

- o *A nanoezüst expozíció csökkenti a zebradánió nőtények által letett ikrák számát.* - A hipotézist vizsgálati eredményeim alapján elvetem.
- o *Az ikrások nanoezüst kitettsége csökkenti az ikrák termékenyülési arányát.* - A hipotézist eredményeim alapján elvetem.
- o *Az anyahalak nanoezüst kitettsége növeli az embriók morfológiai rendellenességének arányát.* - A hipotézist vizsgálati eredményeim alapján elvetem.
- o *A nanoezüst kitettség morfológiai elváltozásokat okoz az ikrások bőrében.* - A hipotézist vizsgálati eredményeim alapján megtartom.
- o *A nanoezüst kitettség morfológiai elváltozásokat okoz az anyahalak kopoltyújában.* - A hipotézist vizsgálati eredményeim alapján megtartom.
- o *A nanoezüst kitettség morfológiai elváltozásokat okoz a zebradánió nőtények májában.* - A hipotézist eredményeim alapján elvetem.
- o *A nanoezüst kitettség morfológiai elváltozásokat okoz az ikrások veséjében.* - A hipotézist eredményeim alapján elvetem.
- o *A nanoezüst kitettség morfológiai elváltozásokat okoz az anyák idegrendszerében.* - A hipotézist eredményeim alapján elvetem.
- o *A nanoezüst kitettség morfológiai elváltozásokat okoz a zebradánió nőtények petefészkében.* - A hipotézist eredményeim alapján elvetem.
- o *Az ikrák nanoezüst kitettsége csökkenti az embriók túlélését.* - A hipotézist vizsgálati eredményeim alapján megtartom.
- o *Az ikrák nanoezüst kitettsége morfológiai elváltozásokat okoz a fejlődő embriókban.* - A hipotézist vizsgálati eredményeim alapján megtartom.
- o *Érvényesül az ikrahéj barrier hatása a nanoezüsttel szemben.* A hipotézist vizsgálati eredményeim alapján megtartom.

6 Következtetések, javaslatok

6.1 Anyai hatás vizsgálat

Az anyai hatás vizsgálata során nem tapasztaltunk szignifikáns csökkenést az ikraszámban, termékenyülési arányban, valamint az embriók morfológiai elváltozásainak vizsgálata során se tapasztaltunk olyan arányú és mértékű elváltozásokat, melyek jelentősen befolyásolhatnák a szaporodási sikert. A vizsgálat során alkalmazott AB vonal egy viszonylag homogén állomány, mégis megmutatkozott az egyedek eltérő érzékenysége a vizsgálat során, mivel minden csoportban nagymértékű szórást tapasztaltunk az ikraszám változásában és a termékenyülési arányban egyaránt.

A szövettani vizsgálatok során megállapítottuk, hogy az alkalmazott 0,5 és 1 ppm koncentrációjú nanoezüst elváltozásokat okozott az öt hetes expozíciót követően, elsősorban a bőrön és a kopoltyún található nyálkasejtek és chloridsejtek számának változásában, mivel ezek a szervek azok, melyek közvetlenül, és folyamatosan érintkeznek a környezetükben jelenlevő nanoezüsttel.

Várhatóan hosszabb idő múltán ezen koncentrációk hatására is növekszik a szövettani elváltozások mértéke mely során más szövetek, szervek is károsodhatnak, továbbá várhatóan csökken az ikraszám és a termékenyülési arány, mivel a halak a környezeti stressz hatására elsősorban a hatások kompenzálására és önfenntartásra fordítják energiájukat, nem a szaporodásra, ivarsejttermelésre.

Kísérleteink eredményei, mint előkísérletek, kiindulópontot jelentenek további vizsgálatok megtervezéséhez. Javaslataink a további vizsgálatok elvégzéséhez többek között hosszabb idejű expozíció alkalmazása, valamint a 0,5 és 1 ppm koncentrációk mellett magasabb koncentrációk beállítása. Az ikrások heti ívása során így többletinformációhoz juthatunk a nanoezüst hosszútávú hatásairól a szaporodásbiológiai paraméterekre és utódokra kifejtett hatásról és a szövettani vizsgálatok során nyomkövethető az anyahalak szervezetére gyakorolt hatás is.

6.2 A nanoezüst hatása a fejlődő embriókra, és az ikrahéj barrier hatásának vizsgálata

A héjas embriók vizsgálata során 50 és 100 ppm nanoezüst kitettség hatására tapasztaltunk megnövekedett mortalitást, míg a héjazott embriók esetében már a 10 ppm nanoezüst kitettség is szignifikáns csökkenést okozott a túlélésben. A héjazott embriók vizsgálata során 5 ppm nanoezüst kitettség nem okozott szignifikánsan magasabb mortalitást a kontrollal összehasonlítva, ugyanakkor a morfológiai rendellenességek aránya a héjazott csoportban már 5 ppm nanoezüst kitettség hatására

szignifikánsan megemelkedett, míg a héjas csoportban az 50 és 100 ppm-es csoportokban tapasztaltunk szignifikáns eredményt morfológiai elváltozások terén. A héjazott és héjzatlan embriók túlélésének összehasonlítása során az 5 ppm nanoezüst koncentrációk esetében nem találtunk szignifikáns különbséget a két csoport között, azonban a 10, 20, 50 és 100 ppm-es koncentrációk esetében a szignifikánsan megemelkedett a mortalitás a héjazott csoportokban.

Az idegrendszer és vér-vérér és vese transzgenikus zebradániók vizsgálata során az idegrendszer fejlődésében nem találtunk elváltozásokat az adott koncentrációk során sem a héjas, sem a héjazott embriók esetében, ugyanakkor a vese, és a vérerek, vérképzőszervek fejlődésére negatív hatást állapítottunk meg. A héjazott embriók vizsgálata során az 5 ppm-es nanoezüst kitettség hatására már találtunk rendellenességeket, míg a héjas egyedek között 20 ppm felett tapasztaltunk jelentős mértékű elváltozásokat.

Kísérleteink alapján megállapítható, hogy az ikrahéj barrier hatása a nanoezüsttel szemben hatékony még 5 ppm-es koncentrációban, ugyanakkor e barrier hatás 10 ppm felett már csökkent és szignifikánsan megemelkedett a mortalitás. Javasolom olyan kísérletek beállítását, melyek során LC_{50} értéket is meg lehet állapítani, viszont a hagyományos toxikológiai tesztek mellett fontos lehet a lárvák, adult halak viselkedésére irányuló vizsgálatokat is elvégezni, mivel ezekből releváns többletinformációkhoz juthatunk a nanoezüst hatásait illetően.

A jövőben fontos megállapítani, hogy a nanoezüst mely koncentrációban hatékony a vízipénészekkel szemben, így a gyakorlatban is alkalmazható nanoezüst koncentráció meghatározásához is közelebb kerülhetünk, azonban a keltetőházi ikrakezelési eljárás kidolgozásához még megannyi információ megszerzése szükséges.

6.3 Következtetések összegzése

A nanoezüst szaporodásbiológiai paraméterekre és az anyahalak szervezetére gyakorolt hosszútávú és akut hatásainak fontos a megismerése mind a keltetőházi ikrakezelési technológia kidolgozásának alapjai miatt, mind a környezetbe kerülő nanoezüst vadon élő halfajokra kifejtett hatásának modellezésére. Az embrió és lárva korosztály a legérzékenyebb korosztályok a különböző környezeti hatásokra. A populációk fennmaradásának alapvető feltétele a sikeres szaporodás és a fiatal egyedek megfelelő arányú túlélése, amennyiben a szaporodási paraméterek romlanak a környezeti hatások kompenzálása miatt és a fiatal, érzékeny egyedek mortalitása megemelkedik, hosszútávon veszélybe kerülhet a populáció fennmaradása.

Az ikrakezelés során fontos olyan anyagokat olyan koncentrációban alkalmazni, amelyek aktív hatásokkal rendelkeznek a vízipénészek által okozott megbetegedések kialakulása ellen, ugyanakkor nem károsítják az embriókat szignifikáns mértékben.

Bár a nanoezüst hatásainak vizsgálati eredményei nagyban elősegítik majd a tanszéken a későbbiekben elvégzett vizsgálatok tervezését és kivitelezését, a nanoezüst alkalmazásának keltetőházi ikrakezelése csak további kísérletek után lehetséges.

7 Összefoglalás

A vízipenészek okozta megbetegedések (Saprolegniosis) a legrégebben ismert halbetegségek közé tartoznak, amelyek elsősorban, a mesterséges ikrakeltetés során okoznak jelentős problémákat a haltenyésztésben. A leggyakrabban alkalmazott vízipenész elleni szer a malachitzöld, valamint a formalin. Mivel ezek az anyagok erősen toxikus hatásúak, az Európai Unió egyértelműen törekszik a betiltásukra, azonban ma még nincs olyan szer, ami kiválthatná használatukat. Helyettesítésükre megfontolandó alternatíva lehet a különböző nanoanyagok (elsősorban a nanoezüst) alkalmazása, azonban ennek a hosszú távú környezeti hatásáról még keveset tudunk. Egy a nanoanyagokra kidolgozott sikeres ikrakeltetési eljárás kifejlesztéséhez elengedhetetlenül szükséges ezen ismeretek megszerzése.

A fentiek miatt munkánk során célul tűztük ki a nanoezüst hosszútávú hatásának vizsgálatát az anyahalak szervezetére. Vizsgáltuk továbbá, hogy milyen hatásokat fejt ki anyailag az utódokra a hosszútávú kezelés, illetve hogy van-e barrier hatása az ikrahéjnak a nanoezüst szemcsékkel szemben.

A hosszútávú vizsgálat során félstatikus rendszerben, 5 héten keresztül tartottunk vad típusú (AB) zebradánió nőstényeket 0,5 mg/L és 1 mg/L koncentrációjú nanoezüst oldatban. A nőstényeket hetente ivattuk, majd vizsgáltuk az így nyert ikrák számát, termékenyülési arányát, valamint a fejlődő embriók morfológiai elváltozásait. A vizsgálat végén szövettani metszeteket készítettünk az ikrásokból, majd a toxikológiai szempontból fontos szerveken kerestük a kezelés hatására bekövetkező elváltozásokat.

A kísérlet második részében vese, idegrendszer és vér-vérér transzgenikus zebradániók héjazott és héjazatlan ikráit kezeltük 5, 10, 20, 50 és 100 mg/L-es nanoezüst koncentrációkkal. A kezelés végén fénymikroszkóppal vizsgáltuk az embriók morfológiai elváltozásait, fluoreszcens mikroszkóppal pedig az adott szervben fellépő esetleges torzulásokat.

Eredményeink alapján elmondható, hogy az 5 hét alatt a nanoezüst kitettség nem gyakorolt szignifikáns csökkenést az ikraszámra és a termékenyülési arányra, valamint jelentős morfológiai elváltozásokat sem okozott az embriókban. A vizsgálat során a kezelt nőstények érzékenységiében nagyfokú egyedi eltéréseket tapasztaltunk. A szövettani vizsgálatok során különböző mértékű elváltozásokat figyeltünk meg. Az ikrák vizsgálata során arra a következtetésre jutottunk, hogy az

ikrahéj bizonyos szinten megvédi a fejlődő embriókat a nanoezüst hatásaitól. A transzgenikus embriók vizsgálata során megállapítottuk, hogy az idegrendszer fejlődésére nem gyakorol negatív hatást a nanoezüst, azonban a vese fejlődésében és különösen a vérerekben és a vérképző szervekben jelentős elváltozásokat tapasztaltunk.

8 Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszöni konzulenseimnek Dr. Csenki Zsoltnak, Bakos Katalinnak és Dr. Hegyi Árpádnak a témaválasztásban nyújtott segítségükért, valamint a vizsgálataim során és a dolgozatom összeállításában nyújtott segítségükért, türelmükért. Szeretném megköszönni Mészáros Erikának, a szövettani metszetek elkészítéséhez és Dr. Baska Ferencnek a metszetek kielemezéséhez nyújtott segítségét, Kovács Róbertnek az embriók morfológiai elbírálásában nyújtott segítségét, továbbá köszönöm Staszny Ádámnak a statisztikai elemzésben nyújtott segítségét. Végül hálás vagyok a Halgazdálkodási Tanszék minden munkatársának támogatásáért.

9 Irodalomjegyzék

- AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY (ATSDR). (1990): Toxicological profile for silver. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry (TP-90-24).
- ANKLEY, G.T., JOHNSON, R.D. (2004): Small fish models for identifying and assessing the effects of endocrine-disrupting chemicals. *ILAR journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources* 45. (4) 469–483.
- ASHARANI P.V., NAIR G., ZHIYUAN H., MANOOR P., VALIYAVEETIL S. (2007): Potential health impacts of silver nanoparticles. Abstracts of Papers, 234th ACS National Meeting, Boston, MA, USA, August 19-23, 2007. pp:TOXI-099.
- ASHARANI, P.V., WU, Y.L., GONG, Z., VALIYAVEETIL, S., (2008): Toxicity of silver nanoparticles in zebrafish models. *Nanotechnology* 19, 255102.
- ASTM INTERNATIONAL, (2006): Terminology for Nanotechnology, ASTM E 2456-06. Available at <http://www.astm.org>.
- BAKER C., PRADHAN A., PAKSTIS L., POCHAN D.J., SHAH S.I. (2005): Synthesis and antibacterial properties of silver nanoparticles. *J Nanosci Nanotechnol* 5:244-249.
- BALLY-CUIF, L., SCHATZ, W.J., HO, R.K. (1998): Characterization of the zebrafish Orb/CPEB-related RNA-binding protein and localization of maternal components in the zebrafish oocyte. *Mechanisms of Development* 77, 31–47.
- BAR-ILAN, O., ALBRECHT, R.M., FAKO, V.E., FURGESON, D.Y., (2009): Toxicity assessments of multisized gold and silver nanoparticles in zebrafish embryos. *Small* 5, 1897–1910.
- BHOL K.C., ALROY J., SCHECHTER P.J.. (2004): Anti-inflammatory effect of topical nanocrystalline silver cream on allergic contact dermatitis in a guinea pig model. *Clin Exp Dermatol* 29:282-287.
- BHOL K.C., SCHECHTER P.J. (2005): Topical nanocrystalline silver cream suppresses inflammatory cytokines and induces apoptosis of inflammatory cells in a murine model of allergic contact dermatitis. *Br J Dermatol* 152:1235-1242.
- BIANCHINI, A., GROSELL, M., GREGORY, S.M., WOOD, C.M., (2002): Acute silver toxicity in aquatic animals is a function of sodium uptake rate. *Environ. Sci. Technol.* 36, 1763–1766.
- BILBERG K., MALTE H., WANG T., BAATRUP E. (2009): Silver nanoparticles and silver nitrate cause respiratory stress in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) *Aquatic Toxicology* 96 (2010) 159–165
- BLADER P., PLESSY C., STRAHLE U. (2002): Multiple regulatory elements with spatially and temporally distinct activities control neurogenin1 expression in primary neurons of the zebrafish embryo. *Mechanisms of Development* 120 (2003) 211–218
- Bollig F., Perner B., Besenbeck B., Köthe S., Ebert C., Taudien S. and Englert C. (2009): A highly conserved retinoic acid responsive element controls, *Development* 136, 2883-2892 (2009) doi:10.1242/dev.031773
- BRAUNBECK T. AND LAMMER E., (2006): Background Paper on fish embryo toxicity assays, UBA Contract Number 203 85 422, pp 3-40
- BRAUNBECK T., BÖTTCHER M., HOLLERT H., KOSMEHL T., LAMMER E., LEIST E., RUDOLF M. AND SEITZ N., (2005): Towards an Alternative for the Acute Fish LC:50 Test in Chemical Assessment The Fish Embryo Toxicity Test Goes Multi-species – an Update, *Altex* 22, 2/05 87-102

- BRYAN G., LANGSTON W. (1992). Bioavailability, accumulation and effects of heavy metals in sediments with special reference to United Kingdom estuaries: A review. *Environ Pollut* 76: 89-131.
- BURRELL R.E., HEGGERS J.P., DAVIS G.J., WRIGHT J.B. (1999): Efficacy of silver-coated dressings as bacterial barriers in a rodent burn sepsis model. *Wounds* 11:64-71.
- BURY N, WOOD C. (1999): Mechanism of branchial apical silver uptake by rainbow trout is via the proton-coupled Na(+) channel. *Am J Physiol Regulatory Integrat Comparat Physiol* 277:R1385-1391
- CARLSON, C., HUSSAIN, S.M., SCHRAND, A.M., BRAYDICH-STOLLE, L.K., HESS, K.L., JONES, R.L., SCHLAGER, J.J., (2008): Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species. *J. Phys. Chem. B* 112, 13608–13619.
- CASTANO A., VEGA. M., BLAZQUEZ T.. AND TARAZONA J.V., (1994): Biological alternatives to chemical identification for the ecotoxicological assessment of industrial effluents: the RTG-2 in vitro cytotoxicity test, *Environ. Toxicol. Chem.* 13, pp. 1607–1611
- CATSAKIS L.H., SULICA V.I. (1978): Allergy to silver amalgams. *Oral Surg* 46:371-375.
- CHEN X., SCHLUESENER H.J. (2008): Nano-silver: A nanoproduct in medical application. *Toxicol Lett* 176:1-12.
- CHOI J.E., KIMA S., AHNA J.H., YOUNA, P., KANGB J.S., PARKC K., YID J., RYUA D-J. (2010): Induction of oxidative stress and apoptosis by silver nanoparticles in the liver of adult zebrafish *Aquat. Toxicol.* (2010), doi:10.1016/j.aquatox.2009.12.012
- CSENKI Z., MÜLLER F., MAGYARY I., HORVÁTH Á., URBÁNYI B. (2006): A zebradánió (Danio rerio), mint a modern biotechnológia modellállata: jelenlegi helyzet jövőbeli lehetőségek, Állatbiotechnológiai Kutatások Magyarországon Konferencia, MTA Budapest
- CSENKI Z., ZAUCKER A., KOVÁCS B., HADZHIEV Y., HEGYI A., LEFLER K.K., MÜLLER T., KOVÁCS R., URBÁNYI B., VÁRADI L., MÜLLER F. (2010): Intraovarian transplantation of stage I-II follicles results in viable zebrafish embryos. *Int J Dev Biol.* 2010;54(4):585-9.
- DOSCH, R., WAGNER, D. S., MINTZER, K. A., RUNKE, G., WIEMELT, A. P., MULLINS, M. C. (2004): Maternal control of vertebrate development before the midblastula transition: mutants from the zebrafish. *Developmental Cell* 6, 771-80.
- DRAKE P.L., HAZELWOOD K.J. (2005): Exposure-related health effects of silver and silver compounds: A review. *Ann Occup Hyg* 49:575-585.
- EIJKEL J.C., VAN DEN BERG A. (2006): The promise of nanotechnology for separation devices--from a top-down approach to nature-inspired separation devices. *Electrophoresis.* Feb;27(3):677-85.
- EISEN, J.S. (1996): Zebrafish make a big splash. *Cell* 87. (6) 969.
- EISLER R. (1997): Silver hazards to fish, wildlife and invertebrates: A synoptic review. Washington, DC, US Department of the Interior, National Biological Service, 44 pp. (Biological Report 32 and Contaminant Hazard Reviews Report 32).
- ELECHIGUERRA J.L., BURT J.L., MORONES J.R., CAMACHO-BRAGADO A., GAO X., LARA H.H., YACAMAN M.J. (2005): Interaction of silver nanoparticles with HIV-1. *J Nanobiotechnol* 3:6.
- ENGESZER, R. E., RYAN, M. J., PARICHY, D.M. (2004): Learned social preferences in zebrafish. *Current biology* 14, 881–884.

- FENSKE, M., MAACK, G., SCHAFERS, C. (2005): An environmentally relevant concentration of estrogen induces arrest of male gonad development in zebrafish, *Danio rerio*. *Environmental toxicology and chemistry / SETAC* 24. (5) 1088–1098.
- FLORES, M. V., LAM, E. Y., CROSIER, K. E., CROSIER, P. S. (2008): Osteogenic transcription factor Runx2 is a maternal determinant of dorsoventral patterning in zebrafish. *Nature cell biology* 10, 346-52.
- FORTIN C., CAMPBELL P. (2000): Silver uptake by the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* in relation to chemical speciation: Influence of chloride. *Environ Toxicol Chem* 19:2769-2778.
- FUNG M.C., BOWEN D.L. (1996): Silver products for medical indication: Risk benefit assessment. *Clin Toxicol* 34:119-126.
- FURST A., SCHLAUDER M.C. (1978): Inactivity of two noble metals as carcinogens. *J Environ Pathol Toxicol* 1:51-57.
- GERHARD G. S., CHENG K. C. (2002): A call to fins! Zebrafish as a gerontological model. *Aging Cell* 1. (2) 104–111.
- GERHART, J. C. (1980): Mechanisms regulating pattern formation in the amphibian egg and early embryo. *Biological Regulation and Development* (ed. R. F. Goldberg), 133-150.
- GORE, A. V., MAEGAWA, S., CHEONG, A., GILLIGAN, P. C., WEINBERG, E. S., SAMPATH, K. (2005): The zebrafish dorsal axis is apparent at the four-cell stage. *Nature* 438, 1030-5.
- GRIFFITT, R. J., HYNDMAN K., DENSLOW N. D., BARBER D. S. (2008): Comparison of Molecular and Histological Changes in Zebrafish Gills Exposed to Metallic Nanoparticles *TOXICOLOGICAL SCIENCES* 107(2), 404–415 (2009)
- GRITSMAN, K., ZHANG, J., CHENG, S., HECKSCHER, E., TALBOT, W. S., SCHIER, A.F. (1999): The EGF-CFC protein one-eyed pinhead is essential for nodal signaling. *Cell* 97, 121-32.
- GRUNWALD, D. J., EISEN, J. S. (2002): Timeline—Headwaters of the zebrafish emergence of a new model vertebrate. *Nature reviews. Genetics* 3. (9) 717–724.
- GULBRANSON S.H., HUD J.A., HANSEN R.C. (2000): Argyria following the use of dietary supplements containing colloidal silver protein. *Cutis* 66:373-376.
- HILL W.R., PILLSBURY D.M. (1939): *Argyria: The pharmacology of silver*. Baltimore, MD: Williams and Wilkins Co.
- HILL, A. J., TERAOKA, H., HEIDEMAN, W., PETERSON, R. E. (2005): Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology* 86. (1) 6–19.
- HOGSTRAND C., GALVEZ F., WOOD C. (1996): Toxicity, silver accumulation and metallothionein induction in freshwater rainbow trout during exposure to different silver salts. *Environ Toxicol Chem* 15:1102-1108.
- HOGSTRAND C., WOOD C.M. (1998): Toward a better understanding of the bioavailability, physiology and toxicity of silver in fish: indications for water quality criteria. *Environ Toxicol Chem* 17:547– 561
- HUSSAIN S.M., HESS K.L., GEARHART J.M., GEISS K.T., SCHLAGER J.J. (2005): In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicol in vitro* 19:975-983.
- JI J.H., JUNG J.H., KIM S.S., YOON J.U., PARK J.D., CHOI B.S., CHUNG Y.H., KWON I.H., JEONG J., HAN B.S., SHIN J.H., SUNG J.H., SONG K.S., YU I.J. (2007): Twenty-eight-day inhalation toxicity study of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats. *Inhal Toxicol* 19:857-871.

- KABASHI E., CHAMPAGNE N., BRUSTEIN E., DRAPEAU P. (2010): In the swim of things: recent insights to neurogenetic disorders from zebrafish. *Trends in Genetics* 26. (8) 373-381.
- KANE, D. A., KIMMEL, C. B. (1993): The zebrafish midblastula transition. *Development* 119, 447-56.
- KASHIWADA, S., (2006): Distribution of nanoparticles in the see-through medaka (*Oryzias latipes*). *Environ. Health Perspect.* 114, 1697–1702.
- KIM J.:S, KUK E., YU K.N., KIM J.H., PARK S.J., LEE H.J., KIM S.H., PARK Y.K., PARK Y.H., HWANG C.Y., KIM Y.K., LEE Y.S., JEONG D.H., CHO M.H.. (2007): Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine* 3:95-101.
- KIM Y.S., KIM J.S., CHO H.S., RHA D.S., KIM J.M., PARK J.D., CHOI B.S., LIM R., CHANG H.K., CHUNG Y.H., KWON I.H., JEONG J., HAN B.S., YU I.J. (2008): Twenty-eight-day oral toxicity, genotoxicity, and gender-related issue distribution of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats. *Inhal Toxicol* 20:575-583.
- KIMMEL C.B., BALLARD W.W., KIMMEL S.R., ULLMANN B., SCHILLING T.F., (1995): Stages of Embryonic Development of the Zebrafish (*Danio rerio*), *Developmental Dynamics*, 203, pp 253-310
- KISS I., (1997): *Toxikológia, Veszprémi Egyetemi Kiadó, Veszprém*, 28-57. p.
- KOMÁROMY L., (1989): *Biológiai gyakorlatok, Pécsi Orvostudományi Egyetem Biológiai Intézet egyetemi jegyzet, Pécs*, 5-32. p.
- KRUTSAY M., (1980): *Szövettani technika, Medicina Kiadó, Budapest*, 15-115. p.
- LABAN G., NIES L. F., TURCO R. F., BICKHAM J. W., SEPÚLVEDA M. S.(2009): The effects of silver nanoparticles on fathead minnow (*Pimephales promelas*) embryos. *Ecotoxicology* (2010) 19:185–195
- LAM, C.W., JAMES, J.T., MCCLUSKEY, R., HUNTER, R.L., (2004): Pulmonary toxicity of singlewall carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation. *Toxicol. Sci.* 77, 126–134.
- LAWSON N. D. AND. WEINSTEIN B. M. (2002) *In Vivo Imaging of Embryonic Vascular Development Using Transgenic Zebrafish. Developmental Biology* 248, 307–318 (2002)
- LEBLANC G.A., MASTONE J.D., PARADICE A.P. (1984) The influence of speciation on the toxicity of silver to fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environ Toxicol Chem* 3:37–47
- LEE K.J., NALLATHAMBY P.D., BROWNING L.M., OSGOOD C.J., XU X.N. (2007): *In vivo* imaging of transport and biocompatibility of single silver nanoparticles in early development of zebrafish embryos. *Am Chem Soc* 1(2):133-143.
- LIAU, S. Y., D. C. READ, W. J. PUGH, J. R. FURR, A. D. RUSSELL. (1997): Interaction of silver nitrate with readily identifiable groups: relationship to the antibacterial action of silver ions. *Lett. Appl. Microbiol.* 25:279-283.
- LIESCHKE, G. J., CURRIE, P. D. (2007): Animal models of human disease: Zebrafish swim into view. *Nature Reviews Genetics* 8, 353-367.
- LIMA, A.R., CURTIS, C., HAMMERMEISTER, D.E., CALL, D.J., FALHABER, T.A., (1982): Acute toxicity of silver to selected fish and invertebrates. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 29, 184–189.
- LUNDE, K., BELTING, H.G. AND DRIEVER, W. (2004): Zebrafish *pou5f1/pou2*, homolog of mammalian *Oct4*, functions in the endoderm specification cascade. *Current biology* 14, 48-55.

- LUOMA S.N., HO Y.B., BRYAN G.W. ET AL (1995): Fate, bioavailability and toxicity of silver in estuarine environments. *Mar Pollut Bull* 31:44–54
- MARSHALL J.P.I.I., SCHNEIDER R.P. (1977): Systemic argyria secondary to topical silver nitrate. *Arch Dermatol* 133:1077-1079.
- MCKIM, J.M. (1977): Evaluation of tests with early life stages of fish for predicting long-term toxicity. *J. Fish. Res. Board Can.* 34, pp 1148-1154.
- MOLNÁR L. - GÁBRIEL R., (2001): Fény- és elektronmikroszkópos mikrotechnika, Dialóg Campus Kiadó, Budapest – Pécs, 55-78. p.
- MONTEIRO, S., GARCIA-SANTOS, S., CARROLA, J., PIRES, E., BOAVENTURA CHUNA, J., FONTAÍNHAS-FERNANDES, A., (2005): The effect of waste water on histological alterations in fish: A monitoring experimental system using renewable energies, 2005 EFITA/WCCA JOINT CONGRESS ON IT IN AGRICULTURE, 1109-1114. p.
- MORGAN I.J., HENRY R.P., WOOD C.M. (1997): The mechanism of acute silver nitrate toxicity in freshwater rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* is inhibition of gill Na⁺ and Cl⁻ transport. *Aquat Toxicol* 38:145–163
- MORONES J.R., ELECHIGUERRA J.L., CAMACHO A., HOLT K., KOURI J.B., RAMÍREZ J.T., YACAMAN M.J. (2005): The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology* 16:2346-2353.
- MUKHI S., PAN X., COBB G. P., PATIÑO R.(2005): Toxicity of hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine to larval zebrafish (*Danio rerio*), *Chemosphere* 61, pp 178–185
- NADDY R.B., REHNER A.B., MCNERNEY G.R. ET AL (2007): Comparison of short-term chronic and chronic silver toxicity to fathead minnows in unamended and sodium chloride-amended waters. *Environ Toxicol Chem* 26:1922–1930
- NADDY RB, GORSUCH JW, REHNER AB ET AL (2007a) Chronic toxicity of silver nitrate to *Ceriodaphnia dubia* and *Daphnia magna*, and potential mitigating factors. *Aquat Toxicol* 84:1–10
- NAGEL, R.,(2002): DarT:The EmbryoTest with the Zebrafish *Danio rerio* – a General Model in Ecotoxicology and Toxicology, *Altex* 19, pp 38-48
- NEBEKER, A.V., MCAULIFFE, C.K., MSHAR, R., STEVENS, D.G., (1983): Toxicity of silver to steelhead and rainbow trout, fathead minnow and *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol. Chem.* 2, 95–104.
- NEMTSAS, P., WETTWER, E., CHRIST, T., WEIDINGER, G., RAVENS, U. (2010): Adult zebrafish heart as a model for human heart? An electrophysiological study. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 48. (1) 161-171.
- NEWPORT, J., KIRSCHNER, M. (1982): A major developmental transition in early *Xenopus* embryos: II. Control of the onset of transcription. *Cell* 30, 687-96.
- NISSONSON AR. (2009) Bottom-up nanotechnology: the human nephron filter. *Semin Dial.* 2009 Nov-Dec;22(6):661-4.
- NORDBERG G., GERHARDSSON L. (1988): Silver. In: Seiler HG, Sigel H, Sigel A, editors. *Handbook on toxicity of inorganic compounds*. New York: Marcel Dekker. p 619_624.
- OBERDORSTER G., SHARP Z., ATUDOREI V., ELDER A., GELEIN R., KREYLING W., COX C., (2004): Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhal. Toxicol.* 16, 437–445.
- PAL S., TAK Y.K., SONG J.M. (2007): Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the Gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 73:1712-1720.

- PANACEK A., KVITEK L., PRUCEK R., KOLAR M., VECEROVA R., PIZUROVA N., SHARMA V.K., NEVECNA T., ZBORIL R. (2006): Silver colloid nanoparticles: Synthesis, characterization, and their antibacterial activity. *J Phys Chem B* 110:16248-16253.
- PELEGRI, F. (2003): Maternal factors in zebrafish development. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists* 228, 535-54.
- PERCIVAL S.L., BOWLER P.G., DOLMAN J. (2007): Antimicrobial activity of silver-containing dressings on wound microorganisms using an in vitro biofilm model. *Int Wound J* 4:186-191.
- POWERS C.M., WRENCH N., RYDE I.T., SMITH A.M., SEIDLER F.J., SLOTKIN T.A. (2010a): Silver impairs neurodevelopment: studies in PC12 cells. *Environ Health Perspect* 2010;118: 73–9.
- POWERS C.M., YEN J., LINNEY E.A., SEIDLER F.J., SLOTKIN T.A. (2010b): Silver exposure in developing zebrafish (*Danio rerio*): persistent effect on larval behavior and survival. *Neurotoxicol Teratol* 2010;32:391–7.
- PRESLEY B., TAYLOR R., BOOHE P. (1990): Trace metals in Gulf of Mexico oysters. *Sci Total Environ* 97/98:551-593.
- REINFELDER J., CHANG S. (1999): Speciation and microalgal bioavailability of inorganic silver. *Environ Sci Technol* 33(11): 1860-1863.
- RUNGBY J., SLOMIANKA L., DANSCHER G., ANDERSEN A.H., WEST M.J. (1987): A quantitative evaluation of the neurotoxic effect of silver on the volumes of the components of the developing rat hippocampus. *Toxicology* 1987;43:261–8.
- RYU, S., HOLZSCHUH, J., ERHARDT, S., ETTL, A. K., DRIEVER, W. (2005): Depletion of minichromosome maintenance protein 5 in the zebrafish retina causes cell-cycle defect and apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 18467-72.
- SANDERS J., ABBE G. (1987): The role of suspended sediments and phytoplankton in the partitioning and transport of silver in estuaries. *Continental Shelf Res* 7:1357-1361.
- SANTOS, E. M., PAULL, G. C., VAN LOOK, K. J., WORKMAN, V. L., HOLT, W. V., VAN AERLE, R., KILLE, P., TYLER, C. R. (2007): Gonadal transcriptome responses and physiological consequences of exposure to oestrogen in breeding zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology* 83. (2) 134.
- SCHMAEHL D., STEINHOFF D. (1960): Studies on cancer induction with colloidal silver and gold solutions in rats. *Z Krebsforsch* 63:586-591.
- SELMAN, K., WALLACE, R. A., SARKA, A., QI, X. (1993): Stages of oocyte development in zebrafish, *Brachidanio rerio*. *Journal of Morphology* 218, 203-224.
- SHAHVERDI A.R., FAKHIMI A., SHAHVERDI H.R., MINAIAN S. (2007): Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Nanomedicine* 3:168-171.
- SHAVLOVSKI M.M., CHEBOTAR N.A., KONOPISTSEVA L.A., ZAKHAROVA E.T., KACHOURIN A.M., VASSILIEV V.B., GAITSKHOKI V.S., (1995): Embryotoxicity of silver ions is diminished by ceruloplasmin—further evidence for its role in the transport of copper, *Biometals* 8 (1995) 122–128.
- SHELLEY W.B., SHELLEY E.D., BURMEISTER V. (1987): Argyria: The intradermal photograph, a manifestation of passive photosensitivity. *J Am Acad Dermatol* 16:211-217.
- SILVER INSTITUTE. (2007): Worldwide Association of miners, refiners, fabricators and manufacturers. Accessed January 2008 from the website: www.silverinstitute.org.

- SILVER S. (2003): Bacterial silver resistance: Molecular biology and uses and misuses of silver compounds. *FEMS Microbiol Rev* 27:341-353.
- SMITH I., CARSON B. (1977): Trace metals in the environment. Vol. 2. Silver. Ann Arbor, MI: Ann Arbor Science Publishers. 469 pp.
- SPENCE, R., RUNA, K. F., REICHARD, M., HUQ, K. A., WAHAB, M. A., AHMED, Z. F., SMITH, C. (2006): The distribution and habitat preferences of the zebrafish in Bangladesh. *Journal of Fish Biology* 69, 1435–1448.
- SPENCE, R., SMITH, C. (2005): Male territoriality mediates density and sex ratio effects on oviposition in the zebrafish, *Danio rerio*. *Animal behaviour* 69, 1317–1323.
- SUN R.W., CHEN R., CHUNG N.P., HO C.M., LIN C.L., CHE C.M. (2005): Silver nanoparticles fabricated in Hepes buffer exhibit cytoprotective activities toward HIV-1 infected cells. *Chem Commun (Camb.)*:5059-5061.
- SUNG J.H., JI J.H., YOON J.U., KIM D.S., SONG M.Y., JEONG J., HAN B.S., HAN J.H., CHUNG Y.H., KIM J., KIM T.S., CHANG H.K., LEE E.J., LEE J.H., YU I.J. (2008): Lung function changes in Sprague-Dawley rats after prolonged inhalation exposure to silver nanoparticles. *Inhal Toxicol* 20:567-574.
- TAKENAKA S., KARG E., ROTH C., SCHULZ H., ZIESENIS A., HEINZMANN U., SCHRAMEL P., HEYDER J. (2001): Pulmonary and systemic distribution of inhaled ultrafine silver particles in rats. *Environ Health Perspect* 109(Suppl. 4):547-551.
- VENUGOPAL B., LUCKEY T.D., editors. (1978): Metal toxicity in mammals. In: *Chemical toxicology of metals and metalloids*. New York: Academic Press. pp 32-36.
- WAGNER, D. S., DOSCH, R., MINTZER, K. A., WIEMELT, A. P., MULLINS, M. C. (2004): Maternal control of development at the midblastula transition and beyond: mutants from the zebrafish II. *Developmental cell* 6, 781-90.
- WAN A.T., CONYERS R.A., COOMBS C.J., MASTERTON J.P. (1991): Determination of silver in blood, urine and tissues of volunteers and burn patients. *Clin Chem* 37:1683-1687.
- WARHEIT, D.B., LAURENCE, B.R., REED, K.L., ROACH, D.H., REYNOLDS, G.A.M., WEBB, T.R., (2004): Comparative pulmonary toxicity assessment of single-wall carbon nanotubes in rats. *Toxicol. Sci.* 77, 117–125.
- WIJNHOFEN S W.P., PEIJNENBURG W J.G.M., HERBERTS C A., HAGENS W I., OOMEN A G., HEUGENS E H.W., ROSZEK B, BISSCHOPS J, GOSENS, DIK VAN DE MEENT, DEKKERS S, DE JONG W H., VAN ZIJVERDEN M, SIPS A J.A.M., & GEERTSMA R E. (2009) Nano-silver - a review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment *Nanotoxicology*, June 2009; 3(2): 109-138
- WILEY B., SUN Y., MAYERS B., XIA Y. (2005): Shape-controlled synthesis of metal nanostructures: The case of silver. *Chem Eur J* 11:454-463.
- WISE J. P., GOODALEA B. C., WISEA S. S., CRAIGE G. A., PONGANE A. F., WALTERF R. B., THOMPSON W. D., AH-KAU NG, ABOUEISS A. E-M., MITANIH H., SPALDINGI M.J., MASON M. D. (2009): Silver nanospheres are cytotoxic and genotoxic to fish cells *Aquatic Toxicology* 97 (2010) 34–41
- WOOD C., MUNGER S., GALVEZ F., HOGSTRAND C. (1994): The physiology of silver toxicity in freshwater fish. In: Andren A, Bober T, editors. *Transport, fate, and effects of silver in the environment. Proceedings of the 2nd international conference*. 11-14 September 1994. Madison, WI, University of Wisconsin Sea Grant Institute. pp 109-114.

WOOTON, R.J. (1998): The Ecology of Teleost Fishes, 2nd edition. Chapman and Hall, London. 404.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). (2002): Silver and silver compounds: Environmental aspects. (Concise international chemical assessment document; 44). 1. Silver _ adverse effects 2. Water pollutants, Chemical 3. Risk assessment 4. Environmental exposure I. International Programme on Chemical Safety II. Series. ISBN 92 4 153044 8 (NLM Classification: QV 297). ISSN 1020-6167. Accessed January 2008 from the website: <http://www.who.int/ipcs/publications/cicad/en/cicad44.pdf>

WRIGHT J.B., LAM K., BURET A.G., OLSON M.E., BURRELL R.E. (2002): Early healing events in a porcine model of contaminated wounds: Effects of nanocrystalline silver on matrix metalloproteinases, cell apoptosis, and healing. *Wound Repair Regen* 10:141-151.

WRIGHT J.B., LAM K., BURRELL R.E. (1998): Wound management in an era of increasing bacterial antibiotic resistance: A role for topical silver treatment. *Am J Infect Control* 26:572-577.

WRIGHT J.B., LAM K., HANSEN D., BURRELL R.E. (1999): Efficacy of topical silver against fungal burn wound pathogens. *Am J Infect Control* 27:344-350.

YAQOUB N., HOLOTTA M., PREM C., KOPP R., SCHWERTE T. (2009): Ontogenetic development of erythropoiesis can be studied non-invasively in GATA-1:DsRed transgenic zebrafish *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 154 (2009) 270–278

YEO M.K., KANG M., (2008): Effects of nanometer sized silver materials on biological toxicity during zebrafish embryogenesis. *B. Korean Chem. Soc.* 29, 1179–1184.

YEO M-K., YOON J-W. (2009): Comparison of the effects of nano-silver antibacterial coatings and silver ions on zebrafish embryogenesis. *Mol Cell Toxicol* 2009;5:23–31.

YIN H.Q., LANGFORD R., BURRELL R.E. (1999): Comparative evaluation of the antimicrobial activity of ACTICOAT antimicrobial barrier dressing. *J Burn Care Rehabil* 20:195-200.

ZHU S., OBERDORSTER E., HAASCH M.L. (2006): Toxicity of an engineered nanoparticle (fullerene, C60) in two aquatic species, *Daphnia* and fathead minnow. *Mar Environ Res* 62(Suppl):S5–S9

Internetes források:

internet1: NyF – Kémia előadások: Nyíregyházi főiskola

<http://www.nyf.hu/others/html/kornyezettud/Kemia-I/kolloidrendszer.htm> (letöltés ideje: 2011.09.15.)

internet2: International Council of Chemical Associations (ICCA)

http://www.icca-chem.org/ICCADocs/Oct-2010_ICCA-Core-Elements-of-a-Regulatory-Definition-of-Manufactured-Nanomaterials.pdf (letöltés ideje: 2011.09.15)

internet3: Sigma-Aldrich Co.

<http://www.sigmaaldrich.com/materials-science/nanomaterials/silver-nanoparticles.html> (letöltés ideje: 2011.08.07)

Szabványok:

OECD 203: OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS Adopted by the Council on 17th July 1992 Fish, Acute Toxicity Test

OECD 210: OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS Adopted by the Council on 17th July 1992 Fish, Early-life Stage Toxicity Test

OECD 212: Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-Fry Stages