

XXXI. OTDK Biológia Szekció

Az 5-fluorouracil Ökotoxicitásának Vizsgálata a Zebradánió (*Danio rerio*) Korai Életszakaszában

Készítette
Tarcai Zsolt
Ökotoxikológus M.Sc. II. évfolyam
Szent István Egyetem

Témavezetők
Kovács Róbert tanszéki mérnök,
Dr. Csenki Zsolt Imre tudományos segédmunkatárs

Gödöllő
2013

Tartalom

1	Bevezetés és célkitűzés.....	1
1.1	Célkitűzés	2
2	Irodalmi áttekintés	3
2.1	Xenobiotikumok a környezetben.....	3
2.1.1	Gyógyszerek a környezetben.....	5
2.2	Daganatok kialakulása.....	7
2.3	Daganat ellenes szerek	7
2.4	Az 5-fluorouracil (5-FU) bemutatása	10
2.4.1	Az 5-FU alkalmazása.....	12
2.4.2	Az 5-FU a környezetben.....	13
2.5	A zebradánió mint kísérleti faj	14
2.5.1	A zebradánió mint modellállat.....	15
2.5.2	A zebradánió embrió fejlődése	17
2.6	CytoThreat projekt rövid ismertetése	23
3	Módszerek.....	25
3.1	Zebradánió ikrák nyérése	26
3.2	5-fluorouracil akut toxicitásának meghatározása	27
3.2.1	Tesztkörülmények.....	27
3.2.2	Végpontok.....	27
3.3	5-fluorouracil krónikus toxicitásának meghatározása	28
3.3.1	Zebradánió kezelése 5-fluorouracillal	28
3.3.2	Tesztkörülmények.....	29
3.3.3	Végpontok.....	30

3.3.4	Kiértékelés	30
4	Eredmények	31
4.1	Akut kísérlet eredménye.....	31
4.2	Krónikus kísérletek eredményei.....	32
4.2.1	Mortalitás eredményei	32
4.3	Testtömeg változás a kezelések hatására.....	32
4.4	Testhossz változása a kezelések hatására	33
4.5	Kondíciós faktor	33
5	Értékelés és következtetések.....	35
5.1	Az akut teszt eredményeinek értékelése.....	35
5.2	A krónikus tesztek eredményeinek értékelése.....	35
5.3	Következtetések.....	36
6	Összefoglalás	37
7	Köszönetnyilvánítás.....	39
8	Irodalomjegyzék	40
9	Mellékletek	44
10	Nyilatkozat.....	50

1 Bevezetés és célkitűzés

Az ipari kemizáció óta megtapasztalhattuk, hogy a vegyi anyagok fejlesztése, előállítása, forgalomba bocsátása és/vagy helyes kezelése megfelelő körültekintést igényel, mert veszélyesek lehetnek az emberre és a környezetükre, nem megfelelő használatuk komoly kockázatokat rejthetnek magukban. Ezek olyan mesterséges anyagok, melyek a természetes környezet számára idegenek (xenobiotikumok). A CAS (Chemical Abstract Service) adatbázisában csaknem 64 millió szerves és szervetlen anyagot regisztráltak 2012 augusztusáig. A xenobiotikumok környezeti viselkedésének megismerése, élő szervezetekre kifejtett hatásának felmérése kiemelt fontosságú, mert káros nem várt hatások jelentkezhettek, melyre jó példa a DDT esete.

E példa is megmutatták, hogy a teszteletlen, vagy nem megfelelően vizsgált hatóanyagok, készítmények potenciális veszélyt jelenthetnek nem csupán a környezetre, de az emberi egészségre is. A tudományos aggodalom éppen ezért folyamatosan nőtt az utóbbi években a kijuttatott kemikáliák miatt, és egyre több publikáció foglalkozik ezek hatásával (KHETAN & COLLINS 2007).

Az utóbbi néhány évtizedben mind nagyobb jelentőséggel bír a különböző humán és állat gyógyászatban használt készítmények élő környezetre gyakorolt hatásának vizsgálata. Az 5-fluorouracil (továbbiakban 5-FU) egy, a kemoterápiában széles körben alkalmazott hatóanyag, mely a nukleinsav szintézis gátlása révén akadályozza a daganatos sejtek növekedését. Az 5-FU és más kemoterápiás szerek elsősorban a kórházi szennyvízen keresztül kerülhetnek kapcsolatba az élő vizekkel. Mivel a kemoterápiában alkalmazott citosztatikumok szisztematikus hatásúak, ezért jogos az a feltevés, hogy környezetbe kerülésük esetén káros hatást fejthetnek ki az élővilág egyes szintjein (GYENES & FÜRTÖS 2007). Ezen vegyületek élő környezetre gyakorolt hatásáról kevés krónikus toxicitásáról pedig még kevesebb információval rendelkezünk.

Az 5-FU egy a sok, széles körben alkalmazott kemoterápiás hatóanyag közül, melynek ökotoxikológiai és genotoxikológiai felülvizsgálata egy FP7-es EU-s pályázati projekt részét képezi. A projekt feladata a vizsgált alá vont rákellenes szerek környezeti és humán kockázat becslése. Az 5-FU ökotoxikológiai vizsgálatát zebradánió (*Danio rerio*) halfajon végeztük el, abból a célból, hogy felmérjük az 5-fluorouracil kemoterápiás hatóanyag akut és krónikus toxicitását. A kapott adatokat az alább ismertetésre kerülő CytoThreat projekt használja fel egy komplex kockázatbecslési eljárás kidolgozásához más kutatásokkal egyetemben.

1.1 Célkitűzés

Vizsgálatunk célja az 5-fluorouracil zebradánió modellre gyakorolt akut és krónikus hatásainak megismerése volt. Ezen eredmények felhasználásával és az irodalomban fellelhető környezeti mintákban mért mennyiségek alapján további célunk volt egy hosszú távú kezelés során az 5-FU fiatal zebradánió egyedek fejlődésére gyakorolt hatásának tanulmányozása is. Hipotézisünk ennek megfelelően az volt, hogy az 5-fluorouracil káros hatással van a zebradániók fejlődésére és a vizsgált paraméterekben eltérést fogunk tapasztalni a kísérlet során.

2 Irodalmi áttekintés

Ebben a fejezetben bemutatásra kerülnek a xenobiotikumok problémájának néhány esete, a gyógyszerek környezetbe jutásának veszélyei és a megakadályozásukra hozott szabályozási rendszer. Bemutatjuk előfordulásukat, mint lehetséges szennyező forrásokat, külön kitérve a citotoxikus kemoterápiás anyagokra. Ismertetésre kerülnek a kemoterápiás szerek típusai, hatásmódjuk és alkalmazásuk betegeken. Bemutatom azt a projektet, mely az általunk vizsgált anyag kockázati felméréssel foglalkozik, továbbá a vizsgált hatóanyagot, és a tesztszervezetet.

2.1 Xenobiotikumok a környezetben

A xenobiotikumok környezeti jelenléte aggodalommal tölti el a köz- és tudományos szférát egyaránt, leginkább azok alig ismert káros hatásai miatt. Különféle iparágak nagy mennyiségben állítanak elő ilyen xenobiotikumokat, és fejlesztenek ki újabbakat. Ilyen a nem régen betiltott poliklórozott bifenilek, de ide tartoznak az olaj termékek égetéséből származó policiklusos aromás szénhidrogének, a fertőtlenítéshez használt triklozán, a műanyag termékek lágyításához használt biszfenol-A, vagy a mezőgazdasági termelésben használatos glifozát ([http11](http://11)).

A helytelen mezőgazdasági vegyszerhasználat miatt számos esetben szermaradékoknak, van kitéve az ember és a természetes környezet egyaránt. 2008-ban magyar hatóságok által ellenőrzött élelmiszer minták 53,4%-ban mutattak ki szermaradékot, a minták 1,7% esetében pedig határérték felett tartalmazott szermaradékot a termék a hazai piacon. Gyakran tapasztalnak ismeretlen kezelésű, piacokon kapható szállítmányban nagyobb mennyiségű szermaradékot. Ilyen anyagok voltak a ditiokarbamátok, kaptán, dimetoát, stb. (MGSZH NTI, 2008).

A glifozát elterjedt gyomirtó szer, melyet nagy mennyiségben alkalmaznak az erdő- és mezőgazdaságban, továbbá a hidrokultúrás növénytermesztésben. A glifozát rezisztens génmódosított (GMO) kultúrnövények terjedésével a glifozát felhasználás radikálisan megnőtt az USA-ban. Az EPA (Environmental Protection Agency, USA) felmérése szerint 2001-ben 38-41 millió kg mennyiségben használták mezőgazdaságban kemikáliák alapanyagaként, míg 2007-re 82-84 millió kg-ra nőtt a felhasználás csak az USA-ban (EPA 2004, 2011). A glifozát kémiaiilag vízben stabil és alacsony mobilitású ezért kicsi potenciálja van a talajvíz elszennyezésében (WHO 2004). Azonban kijuttatás után a nyílt vízbe kerülhet, elsősorban csapadékvíz általi elmosással. Bár alacsony toxicitásúnak írják le a glifozátot, mind a hatóanyagot mind pedig a képződő metabolitját (aminometilfoszfonsav, AMPA) (WHO 2004), egy újabb tanulmány különböző formulák esetében citotoxicitást, endokrin diszruptor (EDC), karcinogenitást, mutagenitást állapítottak meg (GASNIER ET AL., 2009). A glifozátot nagy mennyiségben használó területeken születési rendellenességekről

számoltak be, ennek nyomán egy tanulmány beszámolt a morfogenezis korai szakaszában elváltozásokat okozó hatásáról gerinceseken (PAGANELLI ET AL., 2010). A glifozát jelenleg is engedélyezett hatóanyag.

A környezetbe jutó egy másik veszélyes vegyület csoport, a poliklórozott bifenilek csoportja (PCB). A PCB-ket 1920-tól egészen a 2001-es a Stockholmi Egyezményt követő tiltásig használták. Előnyös tulajdonságaik – mint például nagy hővel szembeni ellenálló képességük, kicsi gyúlékonyságuk és jó szigetelő képességük – miatt széles körben alkalmazták, hidraulikus rendszerekben, transzformátorokban, elektronikai cikkekben, kenőanyagokban, festékekben, műanyag termékek lágyító anyagaként, szigetelőként, stb. A PCB-k toxikussága nagyban függ a Cl atomok számától és helyétől. A szervezetbe bejuthatnak szennyezett levegővel, élelmiszerrel és bőrön át. Bioakkumulatív és biomagnifikációs hajlamúak, valamint az anyatejbe is bekerülhetnek. Humán tanulmányok kimutatták a PCB keverékek káros immunológiai, reprodukciós, dermatológiai hatását, illetve bebizonyosodott karcinogén hatásuk is (WHO 2003). PCB-k közé tartozik a DDT is, mely egy 1948-ban Nobel díjat érdemelt inszekticid. A vegyületről azonban később kiderült, hogy akadályozza a kalcium beépülését a madarak tojáshéjába, valamint erős bioakkumulációs és biomagnifikációs hajlammal rendelkezik ([http12](http://12)).

Más tanulmányok a máig feltérképezetlen szennyező anyagokra hívják fel a figyelmet vizeinkben. Ennek vizsgálata azonban a szennyezések összetettsége miatt rendkívül nehéz. Manapság egyik legjobban kutatott szennyezőanyag csoport a hormon hatású anyagok csoportja (EDC Endokrin Disruptor Chemicals). Az endokrin diszruptorok skálája nagyon széles, kémiai struktúrában nagyon különbözhetnek. Sajnos ezen anyagok szűrésére a szennyvíztisztítók nincsenek felkészülve. Számos természetes és mesterséges anyag rendelkezhet hormonális mellékhatással, mint például gyógyszerek, szteroidok, ipari és háztartási kemikáliák (például biszfenol-A), estápoló termékek, felületaktív anyagok, ipari adalékanyagok (BOLONG 2008), PCB-k, festékek, peszticidek, de akár fémek, is mint a kadmium (BRYNE ET AL., 2009, BURKHARDT-HOLM 2010). Mivel az EDC-k a legkülönbözőbb kémiai csoportokból kerülnek ki ezért szisztematikus hatásuk tanulmányozása nehéz (BURKHARDT-HOLM 2010). Hatásmódjuk miatt az endokrin rendszeren keresztül akár rákos megbetegedéseket is okozhatnak. Felmérések szerint az olyan daganatos megbetegedések száma, amelyet nem tudnak semmilyen ismert kiváltó okra visszavezetni, folyamatosan növekszik. Minden évben 200 ezer új rákos megbetegedést diagnosztizálnak az USA-ban, melynek nyomán közel 40 ezer nő hal meg évente (BRYNE ET AL., 2009). A nők körében az egyik leggyakoribb daganatos megbetegedés a mellrák. Az ilyen típusú megbetegedések száma a hetvenes évektől folyamatosan növekszik (ALTHUIS ET AL., 2005).

2.1.1 Gyógyszerek a környezetben

Egyre nagyobb problémát jelentenek a szennyvízen keresztül felszíni vizekbe jutó gyógyszer hatóanyagok és azok maradványai, annak nem célszervezetre, illetve vízben történő felhalmozódásuk esetén lakosságra kifejtett hatása miatt. Kümmerer és Hempel szerkesztésében 2010-ben megjelent *Green Sustainable Pharmacy* külön kiadványban dolgozza fel ezt a problémakört és keres lehetséges megoldásokat (KÜMMERER & HEMPEL 2010). A tudományos érdeklődés az analitikai módszerek fejlődésével indult meg, a 70-es években, amikor először publikáltak a gyógyszerek jelenlétéről a környezetben. Igazán nagy figyelmet akkor kaptak, amikor kimutatták a mennyiségi növekedésüket az ivóvízben.

Több tudományos publikáció (BESSE ET AL., 2012., STRAUB 2009.) hozza fel példának az 1977-ben megjelent, Charles Hignite által publikált cikket „*Drugs and drug metabolites as environmental contaminants: Chlorophenoxyisobutyrate and salicylic acid in sewage water effluent*”, mint az első vizsgálatok egyikét. A gyógyszeripar fejlődésével a gyógyszergyártás mértéke – ennél fogva a vegyületek környezetbe történő kijutása – tovább nőtt az elmúlt 50 év során. A kimutatható gyógyszer hatóanyagok száma növekedett, részben a nagyobb kijuttatott mennyiség, részben az analitikai technika fejlődése következtében. Egyre nagyobb mennyiségben jelennek meg a környezetben veszélyes hulladékként, így kórházak szennyvíziszapjában, de még a kommunális szennyvízgyűjtőiben is, hiszen az emberi szervezet metabolizált, vagy eredeti formában előbb-utóbb kiüríti ezeket az anyagokat (BESSE ET AL., 2012.). Perzisztens molekulák esetén – a szennyvízrendszeren keresztül ezek az anyagok – eljuthatnak az élő vizeinkbe is. Tényleges környezeti és humán hatásukat csak tudományosan alátámasztott tanulmányokkal lehet megbecsülni. Nagy sokkot kiváltó események, mint a Contergan-botrány, felhívják a figyelmet ezen anyagok mind szélesebb körű toxikológiai és ökotoxikológiai vizsgálatára. A Contergan egy recept nélkül kapható, hányinger ellenes orvosság volt terhes anyák számára az 50-es években. Azonban hatóanyagának (talidomid) egyik metabolitja, a CPS49 érzékszervi gátló hatása miatt a magzatban nem tudtak kialakulni megfelelően a végtagok, és ez mintegy 10.000 végtag-torz gyermek születését eredményezte (VARGESSON 2009, [http1](#))

A gyógyszergyártó cégek célkitűzése, hatékonyabb aktív molekulák kifejlesztése (Active Pharmaceutical Ingredient, API vagy Pharmaceutically Active Compounds, PhAC), melyek fokozott hatékonysággal, biológiai hozzáférhetőséggel, és degradációval szembeni ellenálló képességgel rendelkeznek. Néhány API-nak tulajdonítanak olyan káros hatást, mely a vízi organizmusok fejlődésében káros szerepet tölt be. Az egyik legveszélyesebb csoportnak az endokrin diszruptorokat tartják. Valószínűsíthető, hogy a leglakottabb területek környezetében található vízkészletek a legszennyezettebbek (KHETAN & COLLINS 2007). A szennyezés származhat kórházak

szennyvízkifolyóiból, lakossági szennyvízből, fel nem használt gyógyszerekből, szervezet kiválasztásából (HEBERER 2002). Egy másik kutatásokat áttekintő cikk rámutatott, hogy a fel nem használt gyógyszerek leöblítése, mára nem a legfőbb szennyező forrás, sokkal inkább a páciensek kiválasztásából származó hatóanyagok és metabolitjaik (KHETAN & COLLINS 2007). Makrolid antibiotikumokat (baktériumok fehérjeszintézisét gátló antibiotikumok) mutattak ki több országban $\mu\text{g/L}$ -es koncentráció tartományban, így Németországban, Svájcban és az USA-ban is. Ilyen makrolid antibiotikumok például: klaritromicin, dehidro-erithromicin, roxitromicin. Mérték továbbá szulfonamid (szulfametoxazol, szulfadimetoxin), fluorokinolok, klorafenikol antibiotikumokat is (HEBERER 2002). Ezen vegyületek megjelenése a természetben nagy jelentőségű, mert már a természetes környezetben is kialakulhatnak az antibiotikum rezisztens baktériumtörzsek. Így a fenti vegyületek nem csak mit szennyezők, hanem mint a baktériumos betegségekkel szembeni küzdelmet nehezítő tényezőként is megjelennek.

A környezetben megjelenő vizsgált gyógyszer vegyületek skálája igen széles. Az EU-ban használatos diclofenac egy nem szteroid típusú gyulladás gátlók (Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs, ASIDs) csoportjába tartozó fájdalomcsillapító, mely blokkolja a citokináz enzimeket, ami felelős a prosztaglandinok szintéziséért. Ez utóbbi a szervezetben fájdalmat, lázat és gyulladást okoz. Diclofenacot és metabolitját kimutatták már és ivóvízben is (KHETAN & COLLINS 2007). Bár egyes cikkek a vegyület gyors fotodegradációról számolnak be (BUSSE ET AL., 1999).

Más molekulákat, mint antropogén markereket tartanak számon. Ilyen az antidepresszáns, epileptikum, és skizofrénia kezelésére használt karmazepin, mely igen perzisztens a környezetben. Nagy mennyiségben fordul elő belőle felszíni vizekben, de talajvízből is kimutatták már (CLARA ET AL., 2004).

Ezen okoknál fogva az ipari hulladékok – legyen az vegyipar, gyógyszeripar, mezőgazdasági ipar – kockázatot jelenthetnek. Megfelelő kezelésük kiemelkedő fontosságú. Magyarországon évente mintegy 2000 tonna gyógyszerhulladék keletkezik ([http2](#)); ez a mennyiség fel nem használt, lejárt szavatosságú lakossági gyógyszerekből és azok csomagolóanyagából tevődik össze. Az Egészségügyi Minisztérium 2005-ben kiadott közleménye a következő volt: „A maradványgyógyszerek, mint veszélyes hulladék begyűjtése, szállítása és megsemmisítése uniós tagságunkból is adódó kötelezettség. A lakossági gyógyszerhulladékok kezeléséről az EU-ban nincs egységes szabályozás, a tagállamok saját maguk döntenek ezen speciális hulladék kezeléséről.” ([http2](#)). Hazánkban a jelenlegi szabályozás alapja a 20/2005. (VI. 10.) EüM rendelet - a humán gyógyszerek és csomagolásuk hulladékainak kezeléséről.

2.2 Daganatok kialakulása

A tumor (daganat, vagy neoplazma) fékezhetetlenül osztódó sejtek összessége. Tumort jóindulatúnak (*benginusak*) nevezik, ha az osztódó sejtek a kialakulás helyén maradnak (http3). A tumort rosszindulatúnak (*malignusnak*) nevezik, ha a zabolátlanul osztódó sejtek szétszóródnak a szervezetben, vagyis áttéteket úgynevezett *malignusokat*, másodlagos tumorokat képeznek (http3). A hám eredetű malignus tumorokat nevezzük ráknak. Tehát ha rákról beszélünk, mindig rosszindulatú a daganatról van szó. A daganatok kialakulása a gének szintjén történik normál módon funkcionáló sejtekből. Ekkor a replikációt (sejtosztódást) szabályozó DNS szakasz megváltozik, az osztódás kontrollálatlan módon folytatódik, és az apoptózist elmarad. Ez több lépcsőben játszódik le. Ezen betegség kezelésére fejlesztették ki a kemoterápiában használat citosztatikus – gyorsan osztódó sejteket pusztító – gyógyszereket (citosztatikumokat). A citosztatikumokra ezek a gyorsan osztódó, burjánzó sejteket kimondottan érzékenyek. Mivel a citosztatikumoknak egy része szisztematikus hatású, ezért ezek az összes gyorsan szaporodó sejtet, szövetet támadják a szervezetben. Ilyenek az emésztőrendszer szervei (száj-, gyomor-, bélnyálkahártya), hámsejtek, vérképző sejtek és az ivarsejtek is (GYENES & FÜRTÖS 2007). A legjobban károsított sejteknek, szöveteknek megfelelően jelentkeznek a mellékhatások. Emésztőrendszeri panaszok pl. hányás, hasmenés, étvágytalanság; hámsejt esetében száraz, érzékeny bőr, hajhullás; vérképző sejtek károsodása esetén csökkent fehérvérsejt szám, ennek következtében az immunrendszer gyengülése, fogékonyság betegségekre, vörösvérsejt pusztulás esetén vérszegénység léphet fel. A kemoterápiás szerek az ivarszerveket is károsíthatják. Az itt keletkezett károsodott ivarsejtekkel történő megtermékenyítés fejlődési rendellenességeket idézhet elő a fejlődő embrióban (http4).

2.3 Daganat ellenes szerek

A kemoterápia lényege, hogy a rákos beteget a kezelés során olyan anyagokkal kezelik, amik a tumorsejteket elpusztítják, vagy élettevékenységüket gátolják. Az orvos tudomány fejlődésének köszönhetően az elmúlt évtizedekben a daganatok sebészeti eltávolítása és radioterápiája mellett megjelentek és elterjedtek a gyógyszeres kezelések, az úgy nevezett kemoterápia, mely a komplex onkoterápia meghatározó elemévé vált. A tumorokkal szembeni harcot nehezíti azok eltérő hisztológenezise, kolonális fejlődése, továbbá különböző patobiológiai események előfordulása. Ennek okán különböző molekuláris támadáspontú hatóanyagra van szükség. Kedvező hatás csak akkor várható, ha megfelelő koncentrációban eljutnak a tumor sejtekig és azok szerkezetét maradandóan és szelektíven képesek károsítani (GYENES & FÜRTÖS 2007). A gyógyszerek hatékonyságát befolyásolja a tumorsejtek mikrokörnyezete (például vérellátottság, kötőszövet

menyisége), a tumorsejt-populáció változékonysága (GYENES & FÜRTÖS 2007), ezért egy hatóanyag önmagában ritkán hatásos, ennek okán kombinált kezelés alkalmazására – több hatóanyag együttes használatára – van szükség. A kezelések sikerét korlátozza annak szerény hatékonysága, a rezisztencia kialakulása és a toxikus mellékhatások. Ugyanis citotixikus kemoterápiás szerek alkalmazásakor a szervezet számára tolerált legnagyobb koncentrációt juttatnak a szervezetbe, melynek mellékhatásaként súlyos szöveti károsodások léphetnek fel. További probléma a tumorgátló hatás elmaradása, a gyógyszerekkel szembeni ellenálló képesség kialakulása miatt, melynek elsődleges oka nem a vegyülethez történő adaptáció, hanem a sejtek szelekciója (GYENES & FÜRTÖS 2007). Ezek szerint a gyógyszer megjelenésekor már jelen vannak a gyógszertűró tumorsejtek is. Rezisztencia is kialakulhat, mely mögött például a hibajavító mechanizmusok, a molekuláris támadási pont megváltozása, a hibás apoptózis mechanizmus állhat. A gyógyszer-rezisztencia kialakulásának valószínűsége nő a tumor progressziójával (GYENES & FÜRTÖS 2007).

A daganatos sejten kifejtett hatás tekintetében a **citotoxikus** anyagok azok, melyek toxikusak a sejtre – sejtploriferációt fenntartó molekuláris tényezőket károsítják – és gyors sejthalált idéznek elő. Az ilyen vegyületek támadáspontjának alapját több nem specifikus mechanizmus adja, pl. a sejt külső és belső membránrendszerének roncsolása, anoxia, és az oxidatív forszforiláció gátlása (KISS 1997). A **itosztatikus** anyagok ezzel szemben azok a hatóanyagok, melyek a tumorprogresszióban szerepet játszó molekuláris folyamatokat képesek károsítani (GYENES & FÜRTÖS 2007). Gátolják vagy elnyomják a rákos sejtek növekedését és megsokszorozódását fenntartó molekuláris folyamatokat (BESSE ET AL. 2012.). A citotoxikus gyógyszerek sejtploriferációra közvetlenül ható gyógyszerek, ezért szelektivitásuk korlátozott, ami a sikeres terápia feltétele. A citosztatikumok szelektivitása ezzel szemben jelentősebb, akkor, ha a támadási pontjukat jelentő molekuláris folyamat intenzívebb a tumorsejtekben, mint az egészséges sejtekben. (GYENES & FÜRTÖS 2007).

A citotoxikus gyógyszerek támadáspontja szerinti csoportosítása a következő:

- Antimetabolitok (ilyen az 5-fluorouracil is)
- DNS-támadáspontú gyógyszerek
- Topoizomerázgátlók
- Mitotikus magorsót károsítók.

Az **antimetabolitok** – pl. 5-fluorouracil – hasonlóak a normális anyagcserében megtalálható metabolitokhoz, az anyagcsere egyes lépésének gátlása révén fejt ki hatását. Az aktivált antimetabolit az intracelluláris térben található molekulákhoz kötődnek, leggyakrabban enzimekhez, vagy nukleinsavba épülnek be (DNS, RNS) (GYENES & FÜRTÖS 2007), és nukleinsav szintézis gátló

szerepet töltenek be. Rezisztencia alakulhat ki a nukleozid transzport (nukleozid a nukleinsav építő eleme) hiánya, az antimetabolitot aktiváló enzimek mennyiségének csökkenése, hiánya; a versengő nukleotidok koncentrációjának emelkedése miatt.

DNS-támadáspontú gyógyszerek közvetlenül a DNS-t károsítják keresztkötések kialakításával nagy és kis molekulatömegű molekulák között, és/vagy polinukleotid-lánc törések indukálásával. Ilyenek például az *alkilezőszerek* és *platinavegyületek*, melyek a DNS guanin bázisához kötődve alakítanak ki keresztkötést (GYENES & FÜRTÖS 2007).

A **topoizomerá zgátlók** – ahogy arra nevük is utal – gátolja a topoizomeráz enzimek működését. Ezek közül a topoizomeráz I-nek DNS károsodás helyreállító szerepe van, míg a topoizomeráz II részt vesz a sejtek életképességének fenntartásában (GYENES & FÜRTÖS 2007).

A mikrotubulusok 22 nm átmérőjű, henger alakú struktúrák, melyeket tubulinok építenek fel. A mikrotubuláris rendszer egyik legfontosabb feladata a citoszkeleton felépítésében van (http5). Ugyan csak a mikrotubulusok alkotják a magorsófonalakat is, amely irányítja a kromoszómák mozgását. A mikrotubuláris rendszer felépítése és lebontása, egy dinamikus folyamat, mely a sejt igényeihez igazodva zajlik. A **mitotikus orsót gátló** hatóanyagok e rendszer károsításával fejtik ki hatásukat, két lehetséges módon: a *vinca alkaloidok* gátolják a tubulinok polimerizációját, míg más csoportjuk a *taxánok* akadályozzák a mikrotubulusok lebontását (GYENES & FÜRTÖS 2007).

A fenti vegyületeken kívül **hormon-terápiás** – más néven endokrin terápia – vegyületek is használatosak az onkológiában, de legújabban célzott **antitesteket és citokineket** (sejtek jelátvitelét) befolyásoló vegyületeket is alkalmaznak, amelyek hatása a melignátust fenntartó molekuláris folyamatokat célozza. A malignus tumorban a kiindulási szövet nagymértékben károsodik, jellegzetes struktúrák rendezetlenné, akár felismerhetetlenné válnak (http6). A malignusz transzformációt követően, a tumorsejtek egy részén megmaradnak a hormon receptorok, de eltérően reagálnak, a hormonokra. Ez adja az alapot a hormonok alkalmazására a daganatkezelésben (GYENES & FÜRTÖS 2007). Ilyen a hormon terápiaiban alkalmazott hormonhatású anyagok a progeszteron származékok (BESSE ET AL., 2012). Ezen vegyületek hatása a Luteinizáló hormon (LH) és Follikulus-stimuláló hormon (FSH) termelésén keresztül érvényesül. Közvetett úton a sejt DNS- és az RNS-szintézis szabályozásában okoz zavart, emellett károsítja a kromatin szerkezetét, ami a tumorsejtek pusztulásához vezet (GYENES & FÜRTÖS 2007). Ide tartoznak még az antiösztrogének, az aromatá zgátlók, LH-RH analógok, antiandrogének is.

A daganatos kezelésekben alkalmazott gyógyszerek citotoxikus és citosztatikus hatása között átjárás van, nem különülnek el élesen, ezért sokszor gyűjtőnévként citosztatikus gyógyszereknek

nevezik őket (szóbeli közlés alapján). Ez az elnevezés téves a fentiek alapján, de bevett szokás az egyszerűbb megfogalmazás érdekében. Ugyanis sok hatóanyag nem kizárólag citosztatikus vagy citotoxikus hatású, hanem lehet a kettő együtt, csak az egyik sokkal erősebben kifejeződő a kezelés során. Néhány molekulának a metabolitja rendelkezik a másikat kiegészítő hatásmechanizmussal.

Egy kemoterápiás szer alkalmazható önmagában is. Sok esetben nagyobb, jobb hatékonyság elérése céljából kombinált kemoterápiát alkalmaznak. Ebben az esetben több citosztatikumot kevernek össze intravénás bejuttatás esetén, vagy több tablettát együttes szedését írja fel az orvos. Adjuváns kemoterápiát alkalmaznak sebészeti és sugárkezelés eredményeinek javítása érdekében, annak kiegészítéseként. Olyan esetben is felírhat az orvos citosztatikumot, ha a cél a rák okozta panaszok, fájdalom enyhítése. Ezt palliatív kemoterápiának hívják.

Egy kemoterápiás szer adagolása szertől és körülményektől függően több módon történhet. Lehet orálisan kapszula, vagy folyadék formában; intravénásan; illetve bőr alá fecskendezve (subcutan); és izomba adva (intramuscularis).

2.4 Az 5-fluorouracil (5-FU) bemutatása

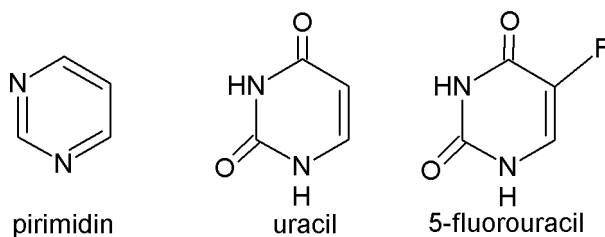
5-fluoropirimidin-2,4(1H3H)dion. Fehér színű, vízben gyengén oldódó, kristályos anyag, kemoterápiás kezelésekhez fejlesztették ki az 1950-es években. Heidelberg és munkatársai fedezték fel az 5-FU enzimgátló szerepét (HEIDELBERG ET AL., 1957). A vegyület osztályozása során az 5-FU-t a WHO az antimetabolitok csoportjába sorolja és L01BC02 kóddal látta el. A besorolás értelmezése a következő:

L	Daganatellenes és immunmoduláns hatóanyagok
L01	Daganatellenes hatóanyagok
L01B	Antimetabolitok
L01BC	Pirimidin analógok
L01BC02	fluorouracil

Ez első betűvel jelölt csoport a főkategória, amit a WHO meghatározott, az azt követő két számjegy a hatóanyag terápiás céljára utal. Következő betű a hatóanyag típusa, majd a szerkezetére utaló besorolás, ami ebben az esetben egy pirimidin analóg. Az utolsó két számjegy pedig a sorszáma az utolsó kategórián belül. Itt hatóanyagok vannak felsorolva, de hatóanyag kombinációk is megjelenhetnek, például a fluorouracil kombinációkat a L01BC52 kód jelöli. (WHO ATC/DDD INDEX) (<http7>).

5-FU gátló hatását három aktív metabolitján keresztül fejti ki. A kiindulási vegyület metabolizációját a dihidropirimidin-dehidrogenáz (DPD) enzim végzi. Az 5-FU katabolizáció nagy része a májban történik. (LONGLEY & JOHNSTON 2007).

- FdUMP (5-fluoro-2'-deoxiuridine-5'-monofoszfát) által indukált timidilát szintetáz gátlása
- FUTP (5-fluorouridin-5'-trifoszfát) beépülése az RNS-be
- FdUTP (5-fluoro-2'-deoxiuridin-trifoszfát) beépülése a DNS-be



2.1. ábra Pirimidin és azzal analóg molekulák

Az 5-FU szerkezetében a pirimidinhez hasonló, azzal analóg molekula. A pirimidin, illetve annak módosultai részt vesznek a nukleinsavak felépítésében. Ilyen pirimidin vázra épülő molekulák a timin, a citozin és az uracil. Ezek alkotják az RNS és DNS molekulákban a nitrogén tartalmú szerves bázis részt (a purin vázas adenin és guanin mellett), ami meghatározza a nukleotidok típusát, a lehetséges bázispárokat a polinukleotid-lánc felépítése során, így felépítve az RNS és DNS láncot. DNS felépítésében adenin-timin, guanin-citozin bázispárok vesznek részt, míg az egyszálú RNS felépítésében az adenin, a guanin, a citozin és az uracil. Mivel az 5-FU szerkezetében csak egy fluor csoportban tér el az uraciltól, ezért sejtosztódás során metabolitja képesek azt helyettesíteni.

Az 5-FU aktív metabolitja az FdUMP timidilát szintetáz (TS) enzim gátlásán keresztül fejti ki hatását. Ebben a tekintetben az FdUMP egy a TS enzim működését irreverzibilisen gátolni képes hatóanyag, amely enzim szükséges a DNS problémamentes replikációjához. A TS katalizálja a deoxiuridin monofoszfát (dUMP) átalakítását redukzív metilezés útján deoxitimidin monofoszfáttá (dTMP), melyhez a metil donort egy folsav, a leukovorin (LV) folsav (5,10-metilén-tetrahidrofolsav, CH₂THF) adja (először a dUMP majd az 5,10-metil-tetrahidrofolsav kötődik az enzimhez). Második lépésben további foszfát felvételével deoxitimidin-trifoszfáttá (dTTP) alakul. Ez utóbbi elengedhetetlen a DNS replikációjához. A timidilát enzimnek van egy aktív centruma, mely a dUMP kötőhelyéül szolgál. Az FdUMP kötődik a TS nukleotid kötőhelyéhez stabil komplexet képezve az enzimmel és az 5,10-metilén-tetrahidrofoszfáttal, aminek következtében nem tudja betölteni a katalizátor szerepét (NOORDHUIS ET AL., 2004; LONGLEY & JOHNSTON 2007). A

folyamat dTTP hiányhoz vezet, mely más dezoxinukleotid (dATP, dGTP és dCTP) szintjének, ingadozását idézi elő. Végezetül az egyensúlyhiány súlyosan zavarja a DNS szintézis és repair mechanizmusokat, ami letális DNS sérülést okoz (ZANG ET AL., 2008). Így gyakorlatilag belehalnak a rákos sejtek a dTTP és a dezoxinukleotidok hiányába. Az 5-FU ezen a támadóponton keresztül – mint a legtöbb rák ellenes hatóanyag – a gyors nukleotid szintézist folytató sejteket támadja. Ez az oka annak, hogy a daganatos sejteken kívül más sejtek is áldozatául esnek a folyamatnak.

DNS esetében az FdUTP, míg RNS esetében az FUTP metabolit ez a helyettesítő molekula. Az FdUTP beépülését segíti az FdUMP alább leírt TS gátlása. Ugyanis a kialakult DTP és dezoxinukleotid számának csökkenése miatt, az FdUTP-nek nem kell versengenie azokkal. Fontos tudni, hogy a DNS károsodás esetén a timint helyére beépülhet pirimidin bázisként az uracil is (WICKRAMASINGHE & FIDA 1994). A TS gátlása nyomán dezoxiuridin trifoszfát (dUTP) akkumulálódik, minthogy a dUMP dTMP-be való konverziója blokkolt. Esetünkben a FdUTP lesz a helyettesítő molekula. Azonban az uracil helyébe lépett molekula kémiaiilag nem ugyanúgy funkcionál, következésképp megáll a DNS replikáció, és maga a sejtosztódás folyamata. Természetesen az 5-FU-t tartalmazó DNS-t a sejt javító mechanizmusai próbálják kijavítani. Ebben nyújt segítséget az uracil-DNS-glikoziláz (UDG) enzim, mely a hibás szakaszokat kivágja és újakat illeszt a helyére, azonban ez hatástalan, minthogy az FdUTP, dUTP nagy arányban van jelen a dTTP mellett. Ezek a folyamatok DNS töréshez vezetnek, a daganatos sejtek nem képesek tovább osztódni. A dUTP okozta DNS sérülés nagyban függ a pirofoszfát dUTP-áz szintjétől, ennek hiányában ugyanis elmarad az akkumulációja (LONGLEY & JOHNSTON 2007).

RNS esetében az FUTP metabolit nagymértékben képes kötődni az RNS-be, zavarva a normál RNS működést. Az RNS molekulákat biológiai működés szerint három nagy csoportba sorolhatjuk: hírvivő RNS-ek (massanger RNS, mRNS), melyek lefordítják a DNS fehérjekódoló szakaszait amelyek megszabják a fehérjék aminosav sorrendjét. Transzfer, vagyis szállító RNS molekulák (tRNS), melyek az aminosavakat szállítják a fehérjeszintézis helyére; és a riboszómális RNS (rRNS), melyek a riboszóma építő eleme a fehérjeszintézisben vesz részt. Ez utóbbi rRNS mintegy 60%-át teszi ki az RNS molekuláknak. FUTP az rRNS képződés pre-rRNS fázisában kötődik az uracil helyére, ezzel megakadályozva a végleges rRNS molekula kialakítását. (LONGLEY & JOHNSTON 2007)

2.4.1 Az 5-FU alkalmazása

A kemoterápiás kezelés során az 5-FU szervezetbe juttatása injekcióval történik, de vannak közvetett úton történő megoldások is. Több tablettás készítmény is alkalmaz capecitabine hatóanyag tartalmú vegyületet, amely a szervezetben a sejtek metabolizációs tevékenységének

eredményeképpen alakul 5-FU molekulává. A metabolizáció legnagyobb mértékben a rákos sejtekben játszódik le, ezért ezt a megoldást specifikusabb módszernek tekintik ugyanolyan hatások mellett, mint ha közvetlenül 5-FU formában juttatnák be (WHARF 2007, 2012).

Adagolás: Leggyakrabban leukovorinnal kombinálva iv. (intra vénás) bolus vagy infúziós kezelés formájában. Intravénás boluskezelés (Mayi-protokoll): 5-FU (425 mg/m^2)/leukovorin (20 mg/m^2) naponta, 5 napon át 4-5 hetente (6. ciklus) (GYENES & FÜRTÖS 2007).

Folyamatos infúziós 5-FU kezelés. (CiFU) 5-FU 45 mg/m^2 24 órás infúzió 5 napon át 4 hetente (6 ciklus) (GYENES & FÜRTÖS 2007).

Bolus/infúziós (De Gramont-protokoll). Leukovorin (200 mg/m^2) iv. 2-órás infúzió → 5-FU (400 mg/m^2) iv. bolus → 5-FU (600 mg/m^2) iv. infúzió 22 órán át 2 napig, 2 hetente ismételve (12 ciklus) (GYENES & FÜRTÖS 2007).

2.4.2 Az 5-FU a környezetben

A kemoterápiás anyagok felhasználásából a környezetbe juttatott mennyiség becsülhető, ennek kifejezése a PECs vagy PEC (predicted environmental concentration(s)) érték számításával lehetséges. Besse és munkatársai (2012) 2004 és 2008. évi 5-FU felhasználás alapján $38,59 \text{ ng/L}$ illetve $39,57 \text{ ng/L}$ -ben határozták meg ezt az értéket Franciaország területre. Ezeket az értékeket a legrosszabb esetre számolták, úgynevezett „worst-case scenario” alapon, vagyis az adott években a felszíni vizekben megjelenő legrosszabb eshetőségre vonatkoztatva. Ebbe nem számolták bele a szennyvíz-kezelőkben a tisztítás során kivett mennyiséget. Ezt beleszámolva $7,72 \text{ ng/L}$ (2004) illetve $7,79 \text{ ng/L}$ (2008) mennyiséggel számoltak a felszíni vizekben. Fontos és megjegyzendő probléma, hogy ezeknek a hatóanyagoknak a felhasználása folyamatosan nő, a cikkben feltüntetett adatok alapján Franciaországban 2004-ben 1690 kg , míg 2008-ban 1733 kg volt ez az érték. Változás állt be a felhasználás helyének trendjében is. Míg 2004-ben 82%-ot, addig 2008-ban már csak 35%-ot használtak fel kórházban ezekből a hatóanyagokból. Az irodalomban szereplő mennyiség alapján ajánlást tettek, hogy a jelenlegi PEC értékek mellett elsősorban olyan anyagokkal kell foglalkozni, melyek „refined PEC” értéke nagyobb 1 ng/L . A refined, vagy korrigált PEC érték az a PEC érték, amelynél figyelembe veszik a vegyület szerkezetben lezajló metabolizációját is. Ennek alapján az 5-FU nem került bele a vizsgálandó vegyületek csoportjába, mivel a korrigált PEC értéke kisebb, mint $0,8 \text{ ng/L}$. Azonban figyelembe kell venni, hogy a capecitabine metabolitja az 5-FU, aminek köszönhetően ez az érték feltételezhetően nagyobb. A capecitabine fogyasztási felhasználása 2004-ben 2620 kg , míg 2008-ban már 5134 kg volt. Az 5-FU és a capecitabine a legáltalánosabban használt kemoterápiás hatóanyagok közé tartozik, 2008-ban a

felhasznált antimetabolitok 90%-át ez a két hatóanyag tette ki. Már csak emiatt is szükséges ökotoxikológiai vizsgálatuk.

Egyes publikációk olyan kísérletekről számolnak be, ahol az 5-FU alacsony koncentráció mellett is erős hatást fejt ki vízi szervezetekre. Zounkova R. et al. (2010) erős toxicitásról számolt be két tesztben *Daphnia magna* reprodukciós és *Pseudomonas putida* növekedésgátlás tesztek elvégzése során; előbbire $EC_{50} = 0,1$ mg/L és LOEC = 0,05 mg/L, utóbbira $EC_{50} = 0,044$ mg/L-es és LOEC = 0,03 mg/L értékkel. A *Desmodesmus subspicatus* esetén végzett alga-növekedés gátlási vizsgálat során az EC_{50} érték 75 mg/L volt.

DeYoung és munkatársai (1996) *Pimephales promelas* halfajon meghatározták az 5-FU fél-halálos koncentrációját, amely a vizsgálatok alapján 2420 mg 5-FU/L volt.

2.5 A zebradánió mint kísérleti faj

A zebradánió (*Danio rerio* vagy korábbi nevén *Brachydanio rerio*) egy édesvízi halfaj, mely igen elterjedt akvárium- és fontos modellállat a biológiai kutatás számos területén. Rendszertani besorolása a következő:



2.2. ábra Zebradánió (*Danio rerio*)

Ország:	Állatok
Törzs:	Gerinchúrosok
Osztály:	Sugaras úszójú halak
Rend:	Pontyalkatúak
Család:	Pontyfélék
Nem:	<i>Danio</i>
Faj:	Zebradánió (<i>Danio rerio</i>)

1922-ben Francis Buchanan-Hamilton írta le *Cyprinus rerio* fajnéven, majd később Shrestha (1978) új helyre a *Danio* nemzetségbe sorolta (http8). Élőhelye az Indiai-félszigeten, és tőle északabbra fekvő területen húzódik. Természetes élőhelyein megtalálható Indiában, Nepálban és Bangladesben. Nevét a testen végighúzódnó kék-fehéren váltakozó horizontálisan húzódnó csíkokról kapta. A hím állat kicsit színesebb és kisebb, a csíkozás az egész testet fedi, még a hasi tájékon is, míg a nősténynek a hasa enyhén duzzadt, ezüstös színezetű. A zebradánió ikrával szaporodó faj. A kifejlett példányok mérete kb. 5-6 cm. Az akváriumban 6-8 közötti pH-jú vízben tartható. Átlagos élettartamuk 2-3 év. Mindenevők, táplálékai többnyire zooplanktonok, rovarok, és fitoplanktonok. Laboratóriumi-, és/vagy akvárium- körülmények között általános haltáppal, illetve élő táplálékként artémia rákkal etethetőek. A faj számára optimális hőmérsékletként különböző szerzők eltérő

értékeket adnak meg. Kimmel (1995) az embriógenézisről szóló tanulmányában 28,5°C-ot jelöli meg optimális hőmérsékletnek, míg az OECD210 a megfelelő átlagos hőmérsékletet 26°C-nak adja meg 2°C-os eltérési tartománnyal.

Ezt az eltérést alapvetően az okozza, hogy a hal trópusi halfajként van számon tartva (http9), azonban ez nem ilyen egyértelmű. Tényleges élőhelyét megnézve láthatjuk, hogy a faj szubtrópusi területeken is előfordul. A szubtrópusi terület a Föld északi és déli féltekének 23,5° és 40° közé eső része a mérsékelt övben. A zebradánió élőhelyei közül ide tartozik Banglades, Nepál és Észak-India. A trópusi éghajlatú területek a Föld Ráktérítője és Baktérítője (Északi-szélesség 23,5° - Déli-szélesség 23,5°) között elhelyezkedő zóna. A zebradánió elterjedési területei közül ide tartozik az indiai Orisza, Karnátaka tartományok és Nyugat-Bengál tartomány egy része (http8). Ennek köszönhető, hogy a faj egy viszonylag szélesebb hőmérsékleti tartományban tartható és kezelhető kísérletek során. A zebradánió embriógenézisét legrészletesebben bemutató alapműként számon tartott tanulmány (KIMMEL ET AL., 1995) trópusi halfajként kezelte a fajt, így az embriógenézist 28,5°C-os inkubációs hőmérsékleten vizsgálta.

2.5.1 A zebradánió mint modellállat

A zebradánió napjainkban az egyik legelterjedtebb modellfaj a hidrotóxicológiában. Ez köszönhető könnyű, és gazdaságos tartásának, nagyobb méretű fajokkal szemben, emellett számos referencia publikáció áll rendelkezésre a faj biológiájáról, ami még vonzóbbá teszi az ökotóxicológiai vizsgálatok alkalmazásához. Ezt mutatja a publikációk emelkedő száma is. 1990-ben ezzel a halfajjal megjelent cikkek száma 100 körülire tehető, míg 2005-re körülbelül 3500-ra növekedett (HILL ET AL., 2005). Morfológiai, biokémiai és fiziológia adatok érhetők el a fejlődés korai szakaszában hímekre és nőstényekre egyaránt, ami miatt még ideálisabban használható toxikológiai kutatások alanyaként, kemikáliák és gyógyszerek káros hatásának felmérésében.

A zebradánió mellett létezik több az OECD által is ajánlott halfaj. Néhány példa ezekre a teljesség igénye nélkül:

- Szivárványos pisztráng (*Oncorhynchus mykiss*)
- Fathead minnow (*Pimephales promelas*)
- Medaka (*Oryzias latipes*)
- Paradicsomhal (*Macropodus opercularis*)

A zebradánió kísérletek számos előnnyel rendelkeznek más fajokon végzett kísérletekhez képest. Az akut toxicitás vizsgálatát egyszerűvé teszi az embriókon végezhető vizsgálat, ugyanis elég azokat Petri-csészében tartani. Ez egy nagyon fontos szempont, mert csökkenti a szükséges

anyagfelhasználást, kevesebb oldatot kell előállítani. Az ikrák vizsgálata helytakarékos, ezért több vizsgálat is futhat egy időben, több ismétlésben. Ezek mellett talán az embriók legfontosabb tulajdonága, hogy mind az ikrahéj, mind pedig maga az embrió áttetsző, valamint fejlődésük az anya testén kívül, *ex utero* zajlik így a bekövetkezett változások vizuálisan nyomon követhetőek, szemben az emlős vizsgálatokkal.

Míg rágcsláló kísérletek nagy hátránya, hogy nagyon drágák, időigényesek és erős törvényi korlátozás alá esnek. Ezzel szemben a halakon végzett tesztelés számos előnnyel bír. Ezek közül nagyon fontos kihangsúlyozni a halembriókon végzett tesztek állatvédelmi jelentőségét is. A Német Állatvédelmi Törvényben, mely az EU állatvédelmi törvényén alapul és köztudottan nagyon szigorú, a halembriókon végzett kísérletezés nem minősül állatkísérletnek amennyiben az nem táplálkozó lárva előtti stádiumon történik (NAGEL, 2002). Ez az érdekes joghézag sok tekintetben megkönnyítheti a kutatók munkáját. Egy másik fontos tulajdonság a fajnak, hogy az embriók fejlődése igen gyors, az inkubációs hőmérséklettől függően 3-4 nap alatt lezajlik (KIMMEL ET AL., 1995).

A zebradánió tartása viszonylag egyszerű, és számos cég foglalkozik direkt zebradánió tartó rendszerek gyártásával és fejlesztésével. Az automata recirkulációs rendszerek a statikus akvárium rendszerekkel szemben lehetővé teszik egy edényben viszonylag sokkal több egyed tartását. Az edények takarítása ritkább időközönként is elég, mert a rendszerbe több helyen szűrőrendszer van beépítve, mely a szerves és egyéb anyagokat kiszűri. Gondoskodik a víz optimális hőmérsékletéről, pH értékéről és folyamatosan ellenőrzi a víz vezetőképességét. Így a jól tartott és rendszeresen szaporított halak akár 200-300 ikrát is adhatnak 7-9 naponként

A zebradánió kísérleti állatként történő felhasználásának új irányát a genetikailag módosított vonalak megjelenése jelenti, melyre már most is számos példa van. Így például a riporter génnel jelölt szervek fejlődésének vizuális vizsgálata nagy segítséget jelent a toxikológiai vizsgálatok során.

Noha a fenti szempontok alkalmassá teszik a zebradániót az ökotoxikológiai vizsgálatokhoz, számos hátrányt is megemlít a szakirodalom. Wedekind és munkatársai (2007) cikkükben megemlítik, hogy az OECD által ajánlott halfajok között nincsenek nyugat-európai halfajok, ezért nem reprezentálják megfelelően az európai vízi rendszereket és azok halfaunáját. Sőt még az sem teljesen tisztázott, hogy a saját élőhelyük faunáját megfelelően reprezentálják-e. Sajnálatos módon az ökotoxikológiában szinte lehetetlen olyan állatfajt találni, ami megfelelően reprezentál egy faunát vagy egy élőhelyet azok összetettsége miatt. Így az egy halfajon végzett ökotoxikológiai tesztek pontossága és relevanciája megkérdőjelezhető, és szükségessé teszi a kísérletek elvégzése

több különböző laborban, és modellállaton is. Ezen felül a vizsgálatoknak célul kell kitűzni a trofikus szintek lefedését is, hogy összetett képet kapjunk egy vizsgálati anyagról. Egy ilyen kísérletsorozat elvégzése után fajszerinti érzékenységi diagramot rajzolhatunk ki, hogy az egyes szintek érzékenysége szemléletes legyen. További problémaként említi meg a laboratóriumi halak beltenyészetét, géndiverzitásuk elvesztését, emiatt esetlegesen fokozódó érzékenységet a kémiai anyagokkal szemben, ami hamis képet eredményezhet a vizsgált mintáról. Továbbá az így tartott állatoknak fokozott az érzékenysége a patogénekkal szemben is. A probléma ebben az esetben összetett. Nincs általánosan elfogadott kép a tudományos világban, hogy az-e a megfelelőbb, ha vadonból beszerzett példányokat használunk fel, melyek már könnyen szennyeződhetnek külső szennyezők által, következésképpen bizonyos mértékű tolerancia vagy épp ellenkezőleg, túlérzékenység alakulhatott ki a tesztanyaggal szemben. További probléma, hogy a modell gyors generációváltása miatt gyorsabban alkalmazkodnak környezeti, kémiai, fizikai változásokhoz, mint a náluk hosszabb ideig élő halfajok és az emlősök melyeknek, ennek folytán sokkal korlátozottabb lehetőségük van genetikában alkalmazkodni a megváltozott körülményekhez (szóbeli közlés alapján). Sok esetben a vizsgálatok végső célja az embert veszélyeztető kockázat becslése. Általában a különböző zebradánióval dolgozó laborok a toxikológiai tesztek során vad típusú, úgynevezett AB vonalat használnak. ([http10](http://10)).

Az eredmények magasabb rendű élőlényekre történő extrapolálhatóságot nehezíti a zebradánió genomja. A zebradánió genom komplexebb a humán genomnál, mert 1 kromoszómapárral többet tartalmaz (HILL ET AL., 2005). Ennek oka a csontos halak evolúciójában keresendő. Az emlős genommal szemben az egész genom duplikálódott. Az eltérésből adódóan, amíg az emlősök bizonyos kémiai anyagokra letalitással reagálhatnak, addig ugyanaz az anyagmennyiség zebradánión lehet, hogy csak kisebb embrionális elváltozásokat okoz (HILL ET AL., 2005).

2.5.2 A zebradánió embrió fejlődése

A zebradánió embriógenezisében 7 nagy periódust különíthetünk el: 1. zigóta periódus, 2. barázdálódás, 3. hólyagsíra periódus, 4. gasztruláció, 5. szegmentáció, 6. pharyngula stádium, 7. a kelés. A megtermékenyített ikrák fejlődése gyors, már 3 nap után kikelnek. A 7 periódus az embriófejlődésre vonatkozik, ugyanis ekkor megy végbe a legnagyobb változás a hal életében. Noha ezek a stádiumok jól megfigyelhetők és leírhatók, a megtermékenyítés után aszinkronizáció következhet be a fejlődés során (KIMMEL ET AL., 1995), amit az ökotoxikológiai felhasználás során érdemes figyelembe venni. Az embriófejlődést az ikra megtermékenyítésétől az embrióból kifejlődött lárva kikeléséig számítjuk. Ez a fejezet csak áttekintésül szolgál a fejlődési stádiumok

rövid bemutatása céljából. A fejlődés áttekintő ismertetését Kimmel, BC., Ballard, WW., Kimmel, RS., Ullmann, B., Schilling, FT., (1995): Stages of Embryonic Development of the Zebrafish. Developmental Dynamics 203(3): 253-310. cikk szolgált alapul.

Zigóta periódus (0-¾ óra)

Ezt a szakaszt az ikra megtermékenyülésétől számítjuk, az első sejtosztódás bekövetkezéséig. Megtermékenyüléskor a zigóta körülbelül 0,7 mm átmérőjű. A zigóta periódusnak mindössze egy állomása van az **1-sejtes állapot (0 óra)**. A megtermékenyülés aktiválja a citoplazma mozgásokat és az osztódást követő 10 percben a nem sziki citoplazma az animális pólusok felé áramlik. Így elkülönül egymástól a csírákorong területe (animális rész) és a szikanyagban gazdag vegetális rész.

Barázdálódó periódus (¾ - 2¼ óra)

Barázdálódás stádiuma alatt a blasztomérák (barázdálódó sejtek) első 6 osztódása következik be 15 percenként. A megtermékenyült petesejt csupán egy része osztódik. Az osztódás meghatározott rendben és irányban történik, a blasztomérák szabályosan helyezkednek el az animális póluson. A 6 osztódás szerint 6 állapotot különböztetünk meg, melyek a következők:

2-sejtes állapot (¾ h): Az első osztódás az animális póluson vertikális irányba történik (akárcsak a következő négy esetben). A keletkező két blasztoméra (sejt) teljesen egyforma.

4-sejtes állapot (1 h): Osztódása nem tökéletes, keresztülfut az animális póluson, ezért elliptikus alakot vesz fel. 2x2 blasztoméra keletkezik.

8-sejtes állapot (1 ¼ h): 2x4 blasztoméra keletkezik, az osztódás folyamán két nem teljes blasztomer alakul ki, ami kettéosztja az animális pólust. Az itt megjelenő osztódási tengely egyben az embrió tengelyét is alkotja.

16-sejtes állapot (1 ½ h): Az osztódás során 4 központi és 12 marginális blasztoméra keletkezik. A szakasz végére a 4 központi blasztoméra elválik a sziktól, míg a 12 marginális blasztoméra citoplazmás hidakkal szorosabb kapcsolatot alakít ki vele. Innentől az osztódást teljes és hiányos szakaszokra osztjuk. Teljes a központi, hiányos a marginális blasztomérák osztódása.

32-sejtes állapot (1 ¾ h): Négy osztódási sík mentén barázdálódnak a sejtek, melyek az első és a harmadik osztódás síkjaihoz hasonlóak. A sejtek 4x8-as csomóban helyezkednek el.

64-sejtes állapot (2 h): Az osztódás horizontális sík mentén történik, ezért az animális póluson ránézésre 32 sejt látszik, csak a sejtek lettek kisebbek. Ezeket a felszínen elhelyezkedő sejteket blasztomer burkoló rétegnek nevezzük (enveloping layer, EVL), alatta található a külföldi szakirodalomban mélyen fekvő, vagyis „deep cells”-nek nevezett sejtek.

Hólyagcsíra periódus (2¼ - 5¼ óra)

Ebben a periódusban a marginális blasztóma átalakul, az embrió elkezd midblaszt állapotba fejlődni. A mélyen fekvő sejtek erőteljes osztódásba kezdenek, a blasztomert burkoló réteg (EVL) egyrétegű epitheliális (hám) réteggé alakul. A mitózis hullámszerűen megy végbe (metaszinkronizált).

128 sejttes állapot (2 ¼ h): A korábbi osztódásokhoz képest ez az osztódás szabálytalanul megy végbe. A 128 sejt félkör alakban helyezkedik el a sziken. Az EVL rendezetlen, 5 rétegű lesz.

256 sejttes állapot (2 ½ h): Ez az utolsó metaszinkronizált osztódás. Az EVL sejtek 7 réteget alkotnak és ellapulnak.

512 sejttes állapot (2 ¾ h): A midblasztula fázis kezdete. Ettől a fázistól kezdve a marginális blasztomérákat *Yolk syncytial layer*nek (YSL) nevezik. Az EVL sejtek 9 réteget alkotnak, elhelyezkedésük immár szabálytalan. Marginális blasztomérák elvesztik kapcsolatukat a sziksejtekkel.

1000 sejttes állapot (3 h): Az EVL első rétegében lévő blasztomérából, annak határán, kialakul az YSL 20 sejtből álló gyűrűje.

High stage (3 ⅓ h): Ez az utolsó állapot, amikor még a blasztoderma a szik fölé csoportosul. Egyes sejtek a tizenkettedik, mások a tizenharmadik osztódási ciklusba kerülnek.

Oblong stage (3 ⅔ h): A blasztoderma még jobban ellaposodik, miközben ráfekszik a szikre. Az YSL is ellaposodik.

Sphere stage (4 h): Ebben az állapotban a blasztoderma még jobban ellaposodik, legalsó sejtrétege és a szik között egy lapos sejtekből álló mélyréteg alakul ki. Az angol nyelvű szakirodalomban ezt „deep cell multilayer” rövidítve DEL sejteknek hívják.

Dome stage (4 ⅓ h): A dome stage során kezdődik meg az epibólia. Az epibólikus fejlődés során az YSL és a csírákorong elkezd körülnőni a szikanyagot. A legmélyebben fekvő blasztomérák a szik legfelső rétegébe kezdenek nyomulni.

30%-os epibólia állapot (4 ⅔ h): Az epibólia magába foglalja a szik felpúposodott részét, az EVL réteget és a DEL sejteket. Az epibólia %-ban azt fejezi ki, hogy a blasztula hány százalékát borítja a sziknek.

Gasztrulációs periódus (5 ¼ - 10 h)

A fejlődés e szakaszán egyes területek átrendeződése következik be, sejtek vándorolnak, más területek növekedésnek indulnak. Kialakul a *germ ring*, mely övszerűen körbefogja az embriót. Ennek a belsejében két sejtréteg válik szét: a hypoblaszt (alsó réteg) és az epiblaszt (felső réteg).

Előbbiből alakul ki a mezoderma (középső csíralemez) és az entoderma (belső csíralemez), utóbbiból pedig az ektoderma (külső csíralemez).

50%-os epibólia állapot (5 ¼ h): A blasztoméra sejtek növekedése tovább folytatódik.

Germ-ring állapot (5 ⅔ h): Megjelenik a *germ ring*, gyűrű alakú képződményt alkotva a blasztoderma körül. Továbbá megjelenik a hypoblaszt és az epiblaszt is.

Shield állapot (6 h): A *germ ring* egy helyen megvastagszik. Ebből fog kialakulni az embrionális pajzs, mely az embrió háti oldalát jelzi.

75% epibólia állapot (8 h): Ebben az állapotban sejtek átrendeződése történik, az embrió hosszanti növekedése folytatódik.

90% epibólia állapot (9 h): Az embrió hasi és háti része elkülönül egymástól. A hypoblaszt és az epiblaszt jól elkülöníthetővé válnak. Megkezdődik a hipoblaszt szeparálódása.

Bud állapot (10 h): A gasztruláció utolsó szakasza. Ekkor fejeződik be az epibólia, amit az őszájnyílás megjelenése mutat. A farki végen kialakul a fark rügy (angolul: bud tail, erről kapta a fejlődési szakasz a nevét).

Szegmentációs periódus (10 – 14 h)

A szegmentáció során erős morfológiai változások indulnak meg. Megjelennek a szomiták (összelvény), amiből kialakulnak az első szervkezdemények, és feltűnnek az első testrészek is. Megszűnik a fark egyoldalú növekedése. Innentől kezdve a többi testrész hosszanti növekedése együtt zajlik le a fark növekedésével. A szomita sejtek myotomnak nevezett része izomsejteket alakít ki. Megjelenik az első izomfonal és a gerinchúrhoz kötődik. Megindul a gerinchúr differenciálódása fej-farok irányban. A szomiták egy másik csoportjából, a sclerotomából a gerincporcai fognak kialakulni. Megjelenik az elővese páros kezdeménye.

A szegmentáció alatt a velőlemez velőcsővé záródik, mely a gerincben és a farki végben a gerincvelőt fogja alkotni, emellett az első neuronok elkezdnek axont növeszteni. Egyes sejtek elvándorolnak az agy és gerincvelő kezdeményből. A feji részen kialakul a szemhólyag, ebből később a szemlencse fog kialakulni.

Ebben a periódusban jelennek meg a zsigeri ívek. Ezekből fog kialakulni az alsó és felső állkapocscsont, nyelv és szájfenék támasztócsont együttes. A szegmentációnak négy szakasza van:

1 szomítás állapot (10 ⅓ h): Az első szomita megjelenésének ideje, ez általában, de nem szükségszerűen a gasztruláció befejeződése után következik be. Egy barázda jelenik meg.

5 szomitás állapot (11 ⅔ h): Megjelenik a fejbég és a szemhólyagok. 8 szomitás állapot környékén megjelennek az elővesék, illetve megtörténik az idegsejtek migrációja.

14 szomitás állapot (16 h): Az embrió testhossza 0,9 mm. Szomitákon kialakul egy jellegzetes V alakzat. Kialakul az agy 4 nagy területe. Faroktól felfelé haladva kialakul a sziktömlő, míg fej felé a szikhólyag.

20 szomitás állapot (19 h): Ebben az állapotban sok látványos változás megy végbe. Az embrió testhossza 1,2 mm. Megjelenik a szemlencse a szemhólyagban. Az elővese vezetéke a törzs egész hosszában kialakul, teljesen körbefogja a sziket és ez mutatja meg az embrió anusát, mely a farok és a törzs határa. Az agy strukturált formát ölt, láthatóvá válik a kisagy (cerebellum) kezdeménye. A mezenchima felhalmozódik a farok hasi (ventrális) részén. A mezenchima olyan, a középső csíralemezből elkülönülő szövetsorozat, melyből kialakulnak az izom- és támasztószövetek, valamint a vérkeringési szervek. Vagyis itt fognak kialakulni a vérszigetek. Egyes neuronok elkezdnek axonokat növesztetni, pl. a gerinc elsődleges mozgató neuronjai, és a törzs myotoma izomsejtjei az első kontrakciókat (összehúzódásokat) mutatják. Ezt általában a 17 szomitás állapotban figyelhetjük meg először.

26 szomitás állapot (22 h): Az embrió testhossza 1,4 mm. Megjelenik az epyphysis (tobozmirigy az agyban), és a hipotalamusz a köztiagyon. A szagló terület megvastagszik, valamint kivehetők az otolith kristályok, melyek az egyenes vonalú gyorsulásra érzékenyek a hallókapszulákban. A vérszigetek jól láthatók, megjelennek az utolsó szomiták is, melyek száma 30-34 között lehet. 22-23. órára megjelenik a farokúszó kezdeménye.

Pharyngula periódus (24 – 48 h):

Ez a periódus a zsigerívek kialakulásának stádiumát jelenti. Ez a periódus a halembrió fejlődésének 1/3-át öleli fel. A farok úszó növekedése tovább folytatódik, megjelennek a mellúszók, és az első pigmentsejtek, megindul a vérkeringés. A mozgás kezd rendezetté válni, vagyis megjelennek az első úszást imitáló mozgások. A szegmentációs periódusban a fej és a farki vég ventrális (hasi) oldala rásimult a szikre. Ebben a periódusban kezdetét veszi a kiegyenesedés. A szegmentáció állapotai a következők:

Prim 5 állapot (24. óra): Az embrió testhossza 1,9 mm. Megvastagszik a mezenchima állomány a 3. szomitánál, itt a mellúszó fog megjelenni. Megindul a pigmentáció. Először a retinában, majd végig a hát mentén. A szív és az előtte elhelyezkedő precardiális zsák láthatóvá válik. A szív ekkor még rendszertelenül ver. Spontán kontrakciók figyelhetők meg a törzsben és farokban. A ciklus végére kialakul a szenzoros motorikus reflex.

Prim 15 állapot (30. óra): Az embrió testhossza 2,5 mm. Befejeződik a farok morfogenezise, és csökken a hosszanti növekedés üteme. Ebben a szakaszban ismét történik sejtándorlás és megindul a vér áramlása.

Prim 25 állapot (36. óra): Az embrió testhossza 2,7 mm. A szik szélessége már csak 1,3-szerese a fejnek. Folytatódik a pigmentáció. A precardiális rész kissé megduzzad, a vér áramlása felgyorsul, és bekapcsolódik a vérkeringésbe a farki artéria és véna, mely már a farokúszó 3/4-ére kiterjed.

High-pec állapot (42. óra): Az embrió testhossza eléri a 2,9 mm-t. A testet és a farkat behálózzák az erek. Megjelenik a mellúszó (amire az állapot neve is utal), a máj és az úszóhólyag szervezdeményei. Erős pigmentáció folyik, a háti és a hasi pigmentáció a farok végéig ér.

Kelési periódus (48-72. óra)

Az embrió fejlődésének utolsó periódusa. Az embriók hosszanti növekedése folytatódik, amihez egyre több sziket használnak fel. A sejtek differenciálódása folytatódik, megjelennek a mellúszó sugarai, a bélrendszer, kopolyúívek, valamint megindul az állkapocs fejlődése. Az állkapocs előretolódik, túl a szemek vonalán, és a száj nyitottá válik. A kiegyenesedés tovább folytatódik. A kelési periódus állomásai a következők:

Long-pec állapot (48. óra): Az embrió testhossza 3,1 mm. A periódus a nevét abból kapta, hogy erőteljes fejlődésnek indul a mellúszó. Megjelennek speciális idegsejtek, a farki végben vakuolizálódó sejtek, és megkezdődik a porcképződés a zsigeri ívekben. A szik fogyása miatt a szik csak kicsit nagyobb a fej méreténél, azonban ez az állapot az 51. órában megszűnik. A hallókapuszulában megjelenik a félkörös ívjárat kezdeménye. A szívzacskó összehúzódása következtében a perikardium jól láthatóvá válik. A véráramlás erőteljes.

Pec-fin állapot (60. óra): Az embrió testhossza 3,3 mm. A fej szélessége meghaladja a szik szélességét. Oldalnézetből látható a széles száj megjelenése, noha még nincs nyitott állapotban. Megkezdődik az állkapocs és kopolyú porcosodása, és izomnyalábok megjelenése. Látható a béltraktus, a mellúszó szinte teljes. A szív másodpercenként hármat ver, ami a továbbiakban nem fog változni.

Előreugró száj megjelenésének stádiuma (72. óra): Az embrió testhossza 3,5 mm. A száj széles, és a szem elé nyúlik, kialakul a kopolyú vérkeringése, és a fül mögötti területen a hal első csontosodási pontja. A mellúszó tovább növekszik. A periódus végére a fej és a törzs egyformán sárgás színű lesz.

Ezt követően az ikrák felrepednek, és kikelnek az állatok. Az embrionális periódusok lejátszódása után lárvának nevezzük az ikrából kikelt állatot. Ekkor még nem képesek rögtön úszni. Az víz alá lesüllyedve fejlődnek tovább, és az első felúszás alkalmával kezdődik meg a saját táplálkozásuk. Az etetés ettől a ponttól válik szükségessé.

Kimmelnek és munkatársainak a zebradánio embriófejlődéséről publikált cikke kiemelt jelentőségű, mert ehhez, mint leírt normál állapothoz viszonyítanak más kísérletek során is. Mivel a zebradánio embriógenézisét 28,5 °C-on vizsgálták, az összehasonlíthatóság érdekében a tesztek elvégzése során ezen az értéken, vagy ehhez közeli értéken ($\pm 1-2^{\circ}\text{C}$) kell inkubálni az embriókat.

2.6 CytoThreat projekt rövid ismertetése

A CytoThreat projekt célja, hogy felbecsülje a környezetbe kerülő, széles körben használt kemoterápiás szerek kockázatát. A kutatást az Európai Unió támogatja egy FP7 (Seventh Framework Programme) pályázaton keresztül. A program célja új analitikai módszer kifejlesztése citosztatikumok és metabolitjaik mérésére, ezek kockázatának feltárása különálló hatóanyagokként és keverékek formájában egyaránt, módszer kidolgozása a környezetben megtalálható mennyiségük becslésére, ökototoxicitásuk, genotoxicitásuk felmérése minél több trofikus szinten a vízi kultúrákban. A program feladata továbbá a választott daganatellenes citosztatikumok környezetben megjelenő koncentrációjának lehetséges késleltetett és visszafordíthatatlan, az élő szervezetekre gyakorolt hatásának vizsgálata.

Az 5-fluorouracil akut és krónikus toxicitásának feltárása zebradánióon (*Danio rerio*) a CytoThreat WP5 (Work Programme 5) projekt részét képezi. A kísérletek során olyan számszerű adatokat kell nyerni a vizsgálatokból, amelyeknek segítségével következtetéseket lehet levonni a vizsgált anyag ökototoxicitásra vonatkozóan. Ilyen mérőszám lehet például a pusztulás aránya kísérleti csoportban. A zebradániós vizsgálatok során mérendő, számszerűsíthető adatok a következők lesznek:

- LC50 érték: 50%-os letális koncentráció, az a koncentráció amitől – ebben az esetben – az egyedek 50%-a elpusztul,
- EC50 érték: 50%-os effektív koncentráció, az a koncentráció, ami valamely farmakológiai, biokémiai vagy élettani hatást idéz elő a populáció 50%-ában (típusuk a vizsgálatnál kerül megadásra),
- NOEC érték (Non Observed Effect Concentration): az a legmagasabb koncentráció, mely a megfigyelt szervezetben még nem váltja ki a vizsgált hatást,

- LOEC érték: legkisebb hatásos koncentráció (Lowest Observed Effect Concentration), az a legkisebb koncentráció, amikor még kifejt valamilyen megfigyelhető hatást.

A vizsgálat sorozat tartalmazott egy akut illetve két krónikus tesztet, melyhez az alapot az OECD 210 nyújtotta, valamint egy kétgenerációs hosszú távú hatást vizsgáló tesztet, melyre még nincs kidolgozva ajánlás. Az OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) Guideline-ok (útmutatók) nemzetközileg kidolgozott, tesztelt és engedélyezett teszteljárások (ajánlások).

Az akut vizsgálatok során elsősorban a vegyület letális hatásának vizsgálatára kerül sor. Az in vivo zebrafish vizsgálati eredmények információt szolgáltatnak kockázatbecslés készítéséhez, és ezek alapján direktívák és ajánlások megfogalmazásához a szabályozásokat készítő hatóságok számára.

3 Módszerek

A kísérletek során egy általánosan használt és elterjedt kemoterápiás hatóanyag az 5-fluorouracil ökotoxicitásának felmérése történt zebradánió modellen. Az 5-FU engedélyezett daganatterápiás készítmény, mely bejuttatás módja szerint több kiszerelésben hozzáférhető a patikákban.

A kísérleteinkhez zebradánió AB vonalat használtunk. A halak a Szent István Egyetem Halgazdálkodási Tanszékéről származtak. Az anyahalakat, állandó vízátfolyást biztosító recirkulációs rendszerben (ZebTec, Tecniplast Inc.), 14 óra világos, 10 óra sötét világítási programon tartottuk a kísérlet megkezdése előtt. A rendszerben a víz $25 \pm 0,5$ °C-os, a pH $7,4 \pm 0,2$, a vezetőképesség 525 ± 50 μ S volt.



3.1. ábra Zebradánió recirkulációs rendszer. Balra halnevelő tartályok, jobbra cirkuláltató egység

Kísérletekben felhasznált eszközök a következők:

- Automata és Pasteur pipetták
- Mérőlombikok
- Mérőhenger
- Szaporító edények
- Szövettenyésztő plétek
- 10 cm átmérőjű Petri-csészék
- Eppendorf csövek

- Halháló
- 3 literes medencék
- Tömegméréshez használatos edények
- Leica M205 FA (type: DFC425 C)
- Carl Zeiss 2480 Si 10 sztereómikroszkóp
- METTLER TOLEDO AB204-S típusú analitikai mérleg

Felhasznált szilárd és folyékony anyagok:

- Rendszervíz
- Dimetil-szulfoxid (DMSO)
- 5-fluorouracil (Sigma-Aldrich CAS. 51-21-8)
- Trizol
- MS-222 altató (Tricain Sigma-Aldrich CAS. 886-86-2)
- 100 mg 5-FU 1 ml DMSO-ban feloldott törzsoldat

A halak elkábításhoz 0,02 %-os Tricaine (ethyl-3-aminobenzoate methanesulfonate) oldatot használtunk. 200 mg Tricain-t feloldottunk 48,95 ml desztillált víz és 1,05 ml 1 M-os Tris (pH 9) keverékében. A törzsoldatot -20 °C-on tároltuk a felhasználásig. A törzsoldatból 4,2 ml-t kivettünk, majd rendszervízzel 100 ml-re egészítettünk ki (TRICAINE, WESTERFIELD 2000). Az így kapott oldattal altattuk el a halakat a mérés előtt.

3.1 Zebradánió ikrák nyerése

Az ikrák nyeréséhez az anya halak egy-egy 3 L-es medencében voltak külön elhelyezve. A halak szaporítást megelőző napon délután szaporító edényekbe lettek kiválogatva. Megelőzendő, hogy az ikrák mellé ürülék kerüljön, ami válogatásukat megnehezíti, a szaporítást megelőző napon az ikrázó halak táplálékának megvonása történt. Az ikrák elfogyasztását megelőzendő, a szaporító edényekbe egy rácsos elem is került, mely alá az ikrák le tudtak süllyedni, így a felnőtt halak számára hozzáférhetetlenné váltak. Minden edénybe eltávolítható válaszfal lett elhelyezve, majd az így előkészített és recirkulációs rendszervízzel feltöltött edényekbe 1-2 nőstény a válaszfal egyik oldalára, és 2-3 hím a válaszfal másik oldalára került. A válaszfalat a kihelyezést követő napon villanykapcsolás után 30-60 perccel kiemeltük. Az így összeeresztett halak 2 órán keresztül ikráztak. Ezt követően a halakat eltávolítottuk a medencéből. Az ikrák Petri-csészébe metilén-kékkel kezelt vízbe kerültek a válogatás idejére. A metilén-kék segít a bakteriális és gombás fertőzések megelőzésében. Ezt követően az ikrák többszöri átmosásával a metilén-kék oldat

eltávolítás következett. Az ikrák minőségét mikroszkóp alatt ellenőriztük és az esetlegesen nem termékenyült szemeket kiválogattuk.

3.2 5-fluorouracil akut toxicitásának meghatározása

A vizsgálatot az OECD Fish Embryo Toxicity (FET) Draft Guideline alapján végeztük el. A teszt protokollban szereplő 48 órás vizsgálati időtől eltérően az embriók 72 óráig vizsgáltuk, hogy minél több információt szerezhessünk a vizsgált anyag toxicitásáról. Ez a megnyújtott vizsgálati idő harmonizál azzal a törekvéssel, mely a közeljövőben megjelenő végleges FET teszt protokollban várhatóan szerepelni fog.

A vizsgálat során az anya állomány által lerakott ikrákat kb. 2-3 órával a termékenyülés után, 2-4 sejtes állapotban helyeztük a kezelő oldatba. Az ikrák állapota felhasználásuk előtt ellenőrzésre került. A vizsgálatokat 24-lyukú szövettenyésztő plétben végeztük. Minden lyukba 2-2 ml folyadék, illetve 1-1 embrió került. Mindkét ismétlésben koncentrációnként 20-20 embriót vizsgáltunk. A vizsgálathoz DMSO oldószer használata volt szükséges. Ennek megfelelően két kontrollt alkalmaztunk, egy rendszervizes és egy DMSO oldószeres kontrollt. A beállított koncentrációk a következők voltak: 10, 100, 200, 1000, 2000, 3000, 4000 mg/l.

3.2.1 Tesztkörülmények

Az oldatok elkészítéséhez rendszer víz volt használva, a víz pH értéke ennek megfelelően 7,5. Az inkubátor folyamatos 27°C-os hőmérsékletet biztosított az embriók számára. A teszt statikus volt, vagyis az oldatcserére nem került sor a 72 óra alatt.

3.2.2 Végpontok

A teszt végpontjai az alábbiak voltak:

- Mortalitás,
- Kikelés sikeressége,
- Torzulások (összes + jellege).

Következő **torzulások** figyelhetők meg:

- Perikardiális ödéma
- Sziki ödéma
- Farok torz
- Teljes torzulás (egyszerre több torzulás típus megléte)

3.3 5-fluorouracil krónikus toxicitásának meghatározása

A kísérlet célja az 5-fluorouracil krónikus ökotoxicitásának felmérése. Zebradánió (*Danio rerio*) halfaj korai életszakaszában megvizsgálni és megállapítani az 5-FU NOEC, LOEC, LC50 értékeket és szubletális hatásokat. Az ikrák kikelési szakaszában a kelés vizsgálata. Mortalitás/túlélési adatok rögzítése embrió, lárva és fiatal egyedekre, illetve a teljes mortalitás a teszt során. A kísérlet alapját az OECD 210 Guideline (Fish, Early Life Stage Test) nyújtotta, mely a kísérlet során nagy mozgásteret enged a laboratóriumoknak a kezelés kialakításában. A kísérlet rendkívül időigényes és nagy odafigyelést igényel. Az itt alkalmazott teszt egyben egy új szabvány bevezetését is jelenti. Ebben a kísérletben szerzett tapasztalatok alkalmat adnak a későbbi tesztek finomításához, melyek az eredmények fejezetben kerül ismertetésre.

3.3.1 Zebradánió kezelése 5-fluorouracillal

A teszt az eredmények fejezetben kifejtett okok miatt két alkalommal voltak elvégezve, két különböző koncentráció sorral. Mindkét esetben oldószer alkalmazására volt szükség a vizsgálat anyag feloldásához. Az oldószer DMSO volt minden esetben. A DMSO megengedett legnagyobb mennyisége 0,1 mg/L DMSO-vizes oldat.

Az első vizsgálathoz 7 koncentrációt, illetve sima vizes és DMSO oldószeres kontrollt kellett készíteni. A vizsgálat 2 (A és B) ismétlésben zajlott a teszt ajánlása szerint. Koncentrációk a következők voltak:

0,01 µg/L, 0,10 µg/L, 1 µg/L, 10 µg/L, 100 µg/L, 1000 µg/L, 10000 µg/L,

plusz a vizes és DMSO oldószeres kontroll. A koncentrációk megválasztásában, figyelembe vettük a pályázati partnerek ajánlásait illetve a protokollban szereplő végpontot is. Minden koncentrációnak azonos mennyiségű DMSO-t tartalmazott, vagyis a legnagyobb koncentrációjú 5-FU oldatnak megfelelő DMSO mennyiséget jelenti, ami megfelelt az engedélyezett legnagyobb DMSO mennyiségnek (0,1 ml/L).

A teszt beállításakor 10 cm-es Petri csészékbe 50-50 embrió lett kihelyezve. Teszteljárásban fél-statisztikus módszer került alkalmazásra. A teljes oldatcsere hetente kétszer történt, ezen felül, amikor a vízben szerves anyag nagyon felhalmozódott részleges oldatcsere lett végrehajtva, ami teljes térfogat legalább felét jelentette. Ikra állapotban az embriók Petri-csészékben voltak tárolva, víz megújításkor pedig új Petri-csészét és oldatot kaptak. Az ikrákat megtermékenyítés után amilyen gyorsan csak lehetett, a teszt koncentrációkba lettek helyezve. Ez fontos, a halak gyors embrionális fejlődése miatt. Kikelés és első felúszás után 1 L-es medencékbe kerültek. Kezdetben 200 ml, majd 0,5 L és 1 L víz került rájuk. A lárvákat nem érte levegő áthelyezés, átöntéssel

kerültek az új medencébe. Ha visszamaradt valamennyi lárva, ezek fel lettek öntve a megfelelő oldattal és áthelyezve szélesre vágott szájú pasztórpipettával. A teszt végéig ezekben a medencékben voltak tartva az állatok. Oldatcsere hetente kétszer volt. A teszt lebontása a 33. napon történt.

Második kísérlet koncentrációi az első eredményei alapján lettek megválasztva. A koncentrációk közötti szorzó faktor 3,2 volt. Koncentrációk a következők voltak:

0,1 mg/L, 0,32 mg/L, 1,024 mg/L, 3,267 mg/L, és 10 mg/L.

Az összes kezelt csoport vize azonos mennyiségű DMSO oldószert tartalmazott. Ebben az esetben is minden kezelés 2 (A és B) ismétléssel zajlott. A halak indulószáma 50 db volt, oldatcsere ismét fél-statikus volt. Az oldatcserek a második kísérletben 2 naponta történtek. Az 1. naptól Petri-csészében 50 ml-es oldat mennyiségekben, 8. naptól 1,5 L-es medencékben 500 ml, 14. naptól 1 L, 20. naptól 4 L-es medencében 1,5 L oldat mennyiségben voltak tartva a halak. Az áthelyezés az első 15 napon átöntéssel, majd a megfelelő méret elérése után gyűrűs hálóval történt. Erre azért volt szükség, mert az első kísérlet elvégzése során erős szerves anyag felhalmozódás volt tapasztalható a két oldatcsere között. Próbáltuk a halakat úgy áthelyezni, hogy a lehető legkevesebb víz jusson a használt vízből az újba. Megvilágítás során a 14. napig nem lett világítási ciklus alkalmazva, utána 14 órás megvilágítás, 10 órás sötét periódusokban voltak tartva. A kísérlet lebontása a 33. napon történt. A lebontás során a hal lárvák MS-222 oldatában voltak altatva. Az altatás során háromfelé lettek osztva: 2 rész tömegméréshez, 1 rész RNS vizsgálathoz. RNS vizsgálathoz ahol lehetett 10 db állatot félre kellett rakni. A tömegméréshez használt tálkák súlya előre le lett mérve. Az altatást követően Leica M205 FA (type: DFC425 C) típusú mikroszkóp alatt voltak fotózva, majd az RNS vizsgálatra szánt halak Trizolba, és mélyhűtőbe lettek helyezve -20 °C-on, a többi pedig METTLER TOLEDO AB204-S típusú analitikai mérlegen került le mérésre. Először nedves tömeg, majd 24 óra 63°C-on történő szárítás után a száraz tömeg is le mérésre került. A halak testhossza a fényképek alapján Image J 1.45 verziójú szoftverrel lett le mérve.

3.3.2 Tesztkörülmények

Mindkét kísérlet során a kikeveréshez szükséges hígító és kontrolvizet a zebradániókra kialakított keringető rendszer vizéből vettük. Ebben az esetben a víz paramétereinek beállítását a rendszer automatikusan elvégezte (7,5 pH, 25°C hőmérséklet). Az embriókori tartás során az inkubátor egyenletes 27°C-ot biztosított. A kísérlet többi része során a víz állandó hőmérsékletét klíma berendezés biztosította. Temperált hőmérséklet állandó 26°C volt. Élelemadagolás mindkét vizsgálat esetében ad libitum az első elúszást követően. Először Scientific food SDS-100-as típusú

eledel, a 2 héttől kezdve Scientific Food SDS-200 és artémia rák volt, minden nap. A kezelés során a felesleges táplálékot és ürüléket el kellett távolítani, hogy megelőzzük a szerves anyag felhalmozódását. Az elhullott egyedeket minden alkalommal el kellett távolítani és jegyzőkönyvben rögzíteni annak mértékét, koncentrációnként és ismétlésenként. Tapasztalat szerint az étrenden szükség szerint változtattunk, hogy javítsuk a túlélést és optimalizáljuk a növekedést.

3.3.3 Végpontok

Embrió állapot: mortalitás, túlélések, kikelések és torzulások (összes + jellege), rendellenes viselkedés naponta egyszer. (Bizonyos mennyiségű torzulás normális a kontrolban.) Következő **torzulások** figyelhetők meg:

- Perikardiális ödéma
- Szik ödéma
- Faroktorz
- Teljes torzulás (egyszerre több torzulás típus megléte)

Teszt végén: súly (nedves és száraz 24 h 60°C), standard testhossz, mortalitás, túlélés. A megfigyelt paraméterek a teszt végére az alábbi információkkal szolgáltak:

- Teljes pusztulás
- Egészséges halak száma a teszt végén
- Kezdeti kikelések száma és végső kikelések száma
- Naponta a kikelések száma
- Hossza és a súlya a túlélő állatoknak
- Száma a deformált lárváknak
- Azoknak a halaknak a száma, amelyeknek abnormális a viselkedése.

3.3.4 Kiértékelés

A kapott értékeket Microsoft Excel programmal dolgoztuk fel. Az akut teszt során az LC50 értéket probit analízis segítségével határoztuk meg (Minitab 16, Minitab Inc.). A LOEC és a NOEC értékek meghatározásakor független 2 mintás t-próbát vagy ANOVA-t alkalmaztunk. A következtetéseket minden esetben 95%-os megbízhatósági szinten hoztuk meg ($p \leq 0,05$). A statisztikai elemzést a GraphPad Prism 4.0 és az R 2.15.1 statisztikai programcsomagokkal, segítségével végeztük. A halak tömege és hosszának értékeléséhez a Dunnett-tesztet használtuk.

4 Eredmények

Ebben a fejezetben ismertetésre kerül a vizsgálatok fejezetben leírt kísérletek eredményei.

4.1 Akut kísérlet eredménye

A FET Teszt időtartamát az előzetes eredmények alapján 72 órára növeltük, hogy az esetleges kelésben bekövetkezett változások is megfigyelhetőek legyenek. A koncentráció tartomány (range finding) megtalálásához 1000 mg/L-es koncentrációig vizsgáltuk az 5-FU hatását. Azonban ebben a tartományban a legnagyobb koncentráció esetében is csak 10%-os mortalitást tapasztaltunk. Ezért a következő vizsgálatban növelnünk kellett a vizsgált koncentráció tartományt. Sajnos az 1000 mg/L-es koncentráció esetébe az oldószerként alkalmazott DMSO mennyisége már 1% volt, ami 100 szorosa a protokollban javasolt mennyiségnek. Ezért itt már nem volt kizárható az oldószer hatása a kezelés során. Ezért DMSO hatásának vizsgálatára a nagyobb koncentráció tartományokban több hígítószeres kontroll vizsgálatot állítottunk be.

Az LC50 érték 72 órás expozíció esetében 2441,6 mg/L (melléklet 9.1. ábra). A nagy mennyiségű oldószer használata miatt a LOEC és a NOEC értékek megállapításhoz szükséges volt az oldószeres kontrollok mortalitásra és a torzulások megjelenésére gyakorolt hatásának vizsgálatára.

A mortalitás és a torzulások megjelenésének tekintetében a LOEC a 2000 mg/l-es koncentráció. Ennél a koncentrációnál volt statisztikailag igazolható az 5-FU hatása a mortalitás és a torzulás arányának növekedésére a negatív kontrolhoz képest. A 2%-os DMSO kezelésnek sem volt statisztikailag igazolható hatása a mortalitás és a torzulások számának növekedésére (mindkét esetben: $p > 0,05$), ugyanakkor a 2000 mg/L-es 5-FU kezelés a 2 %-os DMSO kontrolhoz képest statisztikailag igazolható mértékben növelte a mortalitást ($p < 0,05$ és a torzult ($p < 0,05$) egyedek számát.

A mortalitás és a torzulások megjelenésének tekintetében a NOEC az 1000 mg/L-es koncentráció (melléklet 9.2 ábra). Ennél a koncentrációnál nem volt statisztikailag igazolható különbség a mortalitás és a torzulások megjelenésének (mindkét esetben: $p > 0,05$) tekintetében a negatív kontrolhoz képest.

Az akut vizsgálatok során meghatároztuk a torzulások tekintetében az EC50 értéket. Vizsgálat 72 órás intervalluma alatt az EC50 érték 1249 mg/l volt.

4.2 Krónikus kísérletek eredményei

4.2.1 Mortalitás eredményei

Mindkét vizsgálat során minden vizsgálati csoportban az egyedek mortalitása meghaladta a 46%-ot, melynek fő oka, hogy a vizsgálatot fél-statisztikus rendszerben végeztük. Az első hónapban a kontroll csoportok átlagos mortalitása 62% volt. A relatív magas mortalitás ellenére a teszt eredményeit reálisnak tekinthetjük, mivel a vizsgálat során minden csoport kezelése azonos módon történt. A negatív kontroll és az oldószeres kontroll csoportok eredményei között nem volt statisztikailag igazolható eltérés ($p > 0,05$). Egyedül a 10 mg/L-es kezelés esetében volt a pusztulás mértéke szignifikáns ($p < 0,05$). A 10 mg/L-es koncentráció mindkét csoportjában a mortalitás mértéke meghaladta a 90%-ot (melléklet 9.3. ábra).

A második kísérletben sűrítettük az oldatcseréket, és az elhullások számát napi szinten követtük nyomon. A mortalitás kiértékelése során figyelembe vettük a kezelési hibából adódó pusztulásokat és korrigált érték használatával végeztük a kiértékelést.

A második vizsgálat során a kontroll csoport esetében 47%-os mortalitást tapasztaltunk. A vizes- és az oldószeres kontroll csoportok esetében nem tapasztaltunk statisztikailag igazolható eltérést az állatok pusztulásában ($p = 0,2286$) (melléklet 9.4. ábra). A 10 mg/l-es kezelés esetében 67% volt a mortalitás, ez az eltérés azonban nem volt statisztikailag igazolható. Bár a mortalitás ennél a csoportnál volt a legnagyobb a második kísérletben a pusztulás mértéke nem érte el az első kísérletben tapasztaltat. A DMSO kontroll és az 5-FU kezelt csoportok között nem találtunk statisztikailag igazolható eltérést.

4.3 Testtömeg változás a kezelések hatására

Az első kísérlet esetében az átlagos nedves testtömeg alakulása az egyes koncentrációk esetében jól magyarázható a mortalitási adatokkal. Azokban a koncentrációkban, ahol a mortalitás nagyobb volt az egységnyi víztérben kevesebb hal nagyobbra tudott nőni. Ez legjobban a 10 mg/L-es koncentráció esetében volt tapasztalható (melléklet 9.5. ábra). Ennél a kezelésnél az átlagos nedves testtömeg statisztikailag is igazolhatóan nagyobb volt ($p < 0,05$), mint a kontroll csoportoknál mért testtömeg.

Az átlagos száraz testtömeg esetében mért értékek hasonlóan alakultak, mint amit a nedves testtömegnél tapasztaltunk (melléklet 9.6. ábra). Itt azonban statisztikailag igazolhatóan csak az 1 mg/L-es koncentráció esetében nőtt meg a száraz testtömeg ($p < 0,05$). Ezt a növekedést azonban a

mortalitás nem magyarázza. Tehát elmondhatjuk, hogy az 1 mg/L-es koncentráció esetében a halak átlagos víztartalma alacsonyabb volt.

Második kísérletben az átlagos nedves testtömeg vizsgálata során a 3 mg/L-es koncentrációnál mért értékek szignifikánsan eltértek mind a kontrol ($p = 0,0318$), mind pedig DMSO ($p = 0,0233$) kontrol csoportoknál mért értékektől (melléklet 9.7. ábra).

A többi esetben nem mutatkozott szignifikáns eltérés, melynek lehetséges oka a nagyobb szórás. A második kísérletben a halak nedves tömege nem változott a koncentráció növekedésével arányosan. Ennek egy lehetséges oka az általánosan kisebb mortalitás a kezelésekben az első kísérlethez képest.

Az átlagos száraz testtömeg esetében a második kísérletben mind két kontrol csoporttól csak a 3,276 mg/l-es kezelés tért el statisztikailag igazolható mértékben ($p < 0,05$). Az 1,024 mg/l-es koncentrációtól csak a DMSO kontroll kezelés mutatott szignifikáns eltérést ($p < 0,05$). A 10 mg/l-es kezelés és a kontrol csoportok között nem volt kimutatható különbség. (melléklet 9.8 ábra)

4.4 Testhossz változása a kezelések hatására

Az első kísérlet esetében az 1 és a 10 mg/L-es kezeléseknél a testhossz szignifikáns mértékű növekedését tapasztaltuk ($p < 0,05$) a kontrollhoz képest. A 10 mg/L-es koncentrációnál ez a növekedés egyértelműen magyarázható a mortalitásból adódó kisebb egyedsűrűséggel. Az 1 mg/L-es kezelésnél azonban a kisebb egyedszám nem magyarázhatja a nagyobb testhosszt (melléklet 9.9. ábra).

A testhossz változása a második kísérletben (melléklet 9.10. ábra) a nagyobb koncentrációk esetében hasonlóan alakult, mint amit az első kísérletben tapasztaltunk. Szignifikáns eltérés mutatkozott a kontrollal történő összehasonlítás során a 3,276 mg/L ($p = 0,0019$) és a 10 mg/L ($p = 0,0028$) koncentráció esetében. A DMSO kontrollal történő összehasonlítás is szignifikáns eredményt adott, mind a 3,276 mg/L ($p < 0,0001$), mind 10 mg/L ($p < 0,0001$) esetében. A hossznövekedés változása jól megfigyelhető a melléklet 9.10. ábrán is.

4.5 Kondíciós faktor

A kondíciós faktor a testhossz és a testtömeg arányát mutatja ($\text{testtömeg}/\text{testhossz}^3$). Az első kísérlet esetében az 1 mg/l-es kezelés esetében a kondíciós faktor statisztikailag igazolható mértékben alacsonyabb volt, mint a kontroll csoportoknál számított érték ($p < 0,05$). A 10 mg/L-es

kezelés esetében vélhetően az alacsony egyedsűrűségből adódó nagyobb testméret miatt nem volt tapasztalható a kondíciós faktor csökkenése (melléklet 9.11. ábra).

A második kezeléskor statisztikailag igazolható mértékben csak a 10 mg/l-es koncentrációnál számított kondíciós faktor érték volt alacsonyabb, mint a kontrol csoportoké ($p < 0,05$). Ha a három legnagyobb koncentrációt vesszük szemügyre a második kísérletnél, a koncentráció növekedésével látható, hogyan csökken a kondíció faktor értéke (melléklet 9.12. ábra).

5 Értékelés és következtetések

5.1 Az akut teszt eredményeinek értékelése

Az 5-fluorouracil egy anti-metabolikus hatású citosztatikum, mely hatását az intenzív osztódású sejtekben fejt ki a legnagyobb mértékben. Ezért a vizsgálatok megkezdése előtt arra számítottunk, hogy az intenzíven osztódó embrionális sejtek működését jelentősen befolyásolja majd a kezelés. Ezzel szemben az akut embrió toxicitás teszt során kapott LC50 és EC50 érték alapján azt mondhatjuk, hogy az 5-FU akut embrió toxicitása igen alacsony.

Az irodalomban is hasonló eredményeket találtunk az 5-FU halakra gyakorolt akut toxicitásának tekintetében. DeYoung és munkatársai (1996) *Pimephales promelas* halfajon 2420 mg-ben határozták meg az 5-FU LC50 értékét, ami majdnem megegyezik az általunk zebradánióra megállapított LC50 értékkel. Bár a fenti vizsgálat 120 órával a megtermékenyülés után határozta meg a félhalálos koncentrációt, jól látható, hogy a két igen elterjedt hal embrió modellen az 5-FU toxicitásnak mértéke hasonló.

5.2 A krónikus tesztek eredményeinek értékelése

A krónikus vizsgálatok során kapott eredmények egy sokkal árnyaltabb képet adnak a citosztatikum zebradániók fejlődésére gyakorolt hatásáról. Az alacsony koncentrációk (10 ng/l – 100 µg/l) esetében nem tapasztaltunk semmilyen változást a vizsgálat 33 napja alatt.

A mortalitás tekintetében egyértelműen csak a legnagyobb, 10 mg/l-es koncentráció esetében volt tapasztalható igazolható hatás. A nedves testtömeg alapján a 3,276 és a 10 mg/l-es koncentrációk esetében volt tapasztalható az átlagos testtömeg növekedése, amit csak a 10 mg/l-es kezelésnél magyarázhatunk a kisebb egyedszámból adódó nagyobb mérettel. A száraz testtömeg esetében a 3,276 és a 10 mg/l mellett már az 1 mg/l-es koncentrációnál is igazolható volt a halak alacsonyabb víztartalma. Az első kísérletben az 1 és a 10 mg/l-es, míg a második kísérletben a 3,276 és a 10 mg/l-es kezelésnél volt tapasztalható a halak nagyobb testhossza. Azonban ez a nagyobb testhossz és testtömeg csak a 10 mg/l-es koncentrációnál magyarázható a mortalitással.

A kondíciós faktor értékek is nagyon érdekes információkkal szolgáltak a kezelés hatásáról. Statisztikailag igazolhatóan csak az első kísérlet során volt tapasztalható az 1 mg/l-es kezelés esetében a kondíciós faktor csökkenése. A második kísérlet során a három legnagyobb koncentráció esetében egy csökkenő tendencia volt megfigyelhető, ám csak a 10 mg/l-es kezelés mutatott

szignifikáns eltérés a kontrol csoport értékeihez képest. Tehát azoknál a koncentrációknál a halak testhossza testtömeghez viszonyított arányaiban nagyobb volt, mint a kontrol csoportoké.

5.3 Következtetések

Az 1 mg/l-t meghaladó koncentrációk esetében megváltoztak a zebradánió lárvák fejlődése során a test arányai, mely egy igen érdekes és új tudományos eredmény az 5-fluorouracil-lal kapcsolatban. A testtömeg és a testhossz aránya mellett a száraz testtömeg változása az, mely csak a kezelés hatásával magyarázható. Ezen eredmények alapján feltételezzük, hogy az 5-FU hatására változás következett be a fejlődő lárvák anyagcseréjében.

6 Összefoglalás

Xenobiotikumok környezetbe juttatása egyre nagyobb aggodalommal tölti el a köz és tudományos szférát, ezért növekvő figyelmet fordítanak az ilyen anyagok kockázatának felméréséhez. Az kockázatbecslő vizsgálatok nélkülözhetetlen eleme az ökotoxikológiai vizsgálatok elvégzése, melyet törvényileg megkövetelnek a hatóságok is. Számos olyan feltáratlan hatású, a humán és állat gyógyászatban alkalmazott készítmény és hatóanyag jut ki a környezetbe, melyekről kevés információval rendelkezünk. Az egyik ilyen kevésbé vizsgált vegyület csoport a kemoterápiás hatóanyagok csoportja.

Az 5-fluorouracil egy olyan antimetabolikus hatású kemoterápiás szer, mely a nukleinsav szintézis gátlása révén akadályozza meg a rákos sejtek növekedését. Mivel a szer citosztatikus hatással rendelkezik, ezért környezetbe jutása és nem célszervezetekre kifejtett hatása komoly problémákat okozhat a különböző szervezetekben. Az utóbbi években sajnos egyre nagyobb mennyiségben alkalmaznak daganatellenes hatóanyagokat, melyek környezetbe jutása immár nem csak a kórházak szennyvizével, de a kommunális szennyvizekkel is jelentős, leginkább az otthoni – tablettás – kezelések terjedése miatt.

A vizsgálatunk célja egy széles körben alkalmazott kemoterápiás hatóanyag, az 5-fluorouracil ökotoxicitásának felmérése a zebradániók (*Danio rerio*) korai életszakaszában. Az akut embrió toxicitás vizsgálatot (FET Test) az OECD Draft Guideline alapján, míg a krónikus vizsgálatot az OECD 210 Guideline alapján végeztük. A vizsgálat végpontjai a mortalitás, az embrionális torzulások, a kelés idejének változása, valamint a testtömeg és a testhossz voltak. További cél volt a LOEC, NOEC, LC50, és EC50 értékekkel kifejezni az 5-fluorouracil toxicitását. A vegyület ökotoxikológiai felülvizsgálata a CytoThreat nevű FP7-es Európa Unió pályázat részét képezi, melynek végső célja egy komplex környezeti kockázatbecslés a projekt során vizsgált különböző citosztatikumokra.

A FET teszt során az LC50 érték 72 órás expozíció esetében 2441,6 mg/l volt. A mortalitás és a torzulások megjelenésének tekintetében a LOEC a 2000 mg/l-es koncentráció volt. A krónikus vizsgálat során 7 koncentrációt és két kontrollt (vizes, K és oldószeres, DMSO) alkalmaztunk. A koncentrációsor 10 ng/l-ről indult és egy nagyságrenddel növekedett 10 mg/l-ig. A mortalitás esetében a kontrollhoz képest csak a legnagyobb koncentráció mutatott igazolható eltérést. A nedves testtömeg és a száraz testtömeg mérésnél az 1 mg/l, 3,276 mg/l és 10 mg/l-es koncentrációknál volt igazolható az eltérés. A testhossz vizsgálatokor az 1 és 10 mg/L koncentráció egyedei mutatottak statisztikailag igazolható növekedést a kontroll egyedekhez képest. A kondíció

faktor esetében szintén az 1 és 10 mg/L koncentrációnál tapasztaltuk igazolhatóan alacsonyabb értékeket a kontrol csoporthoz képest.

Eredményeink alapján valószínűsíthetően az 5-fluorouracil krónikus hatásaként megváltozott a kezelt zebradánio lárvák anyagcseréje az 1 mg/l feletti koncentrációknál.

7 Köszönetnyilvánítás

Köszönetet mondok konzulenseimnek, Kovács Róbertnek és dr. Csenki Zsoltnak, akik koordinálták munkámat a kísérlettervezés és kivitelezése során. Elláttak tanácsaikkal és segítettek, amikor arra szükség volt.

Köszönetet mondok Gazsi Gyöngyinek, Bencsik Dórának, akik készséggel segítettek munkámat a laborban.

8 Irodalomjegyzék

- ALTHUIS MD., DOZIER JM., ANDERSON WF., DEVESA SS., BRINTON LA. (2005): Global trends in breast cancer incidence and mortality 1973-1997. *Int J Epidemiol* 34(2):405-12.
- BESSE JP., LATOUR JF., GARRIC J. (2012): Anticancer drugs in surface waters: what can we say about the occurrence and environmental significance of cytotoxic, cytostatic and endocrine therapy drugs? *Environment International* 39(1): 73-86.
- BOLONG N., ISMAIL AF., SALIM MR., MATSUURA T. (2008): A review of the effects of emerging contaminants in wastewater and options for their removal. *ScientDirect* 239(1): 229-246.
- BURKAHARDT-HOLM P. (2010): Endocrine Disruptors and Water Quality: A state of-the-Art Review. *Water Resources Development* 26(3): 447-493.
- BUSSER HR., POIGER T., MÜLLER MD. (1999): Occurrence and Environmental Behavior of the Chiral Pharmaceutical Drug Ibuprofen in Surface Waters and in Wastewater. *Environ.Sci. Technol.*, 33:2529-2535.
- BYRNE C., DIVEKAR SD., STORCHAN GB., PARODI DA., MARTIN MB. (2009): Cadmium--a metallo hormone? *Toxicol Appl Pharmacol.* 238(3): 266-71.
- CLARA M., STRENN B., KREUZINGER N. (2004): Carbamazepine as a possible anthropogenic marker in the aquatic environment: investigations on the behaviour of Carbamazepine in wastewater treatment and during groundwater infiltration. *Water Res*, 38(4):947-54.
- DEYOUNG DJ, BANTLE JA, HULL MA, BURKS SL. (1996): Differences in sensitivity to Environ Contam Toxicol 56: 143–150.
- GASNIER C., DUMONT C., BENACHOUR N., CLAIR E., CHAGNON MC., SÉRALINI GE. (2009): Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines. *Toxicology.* 262(3):184-91.
- GYENES K., FÜRTÖS ZS. (2007): Farmakológia, Farmakológiai és farmakoterápia. *MEDICINA Könyv Kiadó, Budapest*, 949-982. p
- HEBERER T. (2002): Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicol Letters*, 131(1-2):5-17.
- HEIDELBERGER C., CHAUDHURIK NK., DANNEBERG P., MOOREN D., GRIESBACH L., DUSCHINSKY R., SCHNITZER RJ., PLEVEN E., SCHEINER J., (1957): Fluorinated pyrimidines, a new class of tumour-inhibitory compounds. *Nature*, 179(4561): 663-666.

- HILL AJ., TERAOKA H., HEIDEMAN W., PETERSON RE. (2005): Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicological Sciences* 86(1):6-19.
- KHETAN SK., COLLINS TJ. (2007): Human Pharmaceuticals in the Aquatic Environment: A Challenge to Green Chemistry. *Chem Rev*, 107(6):2319-64.
- KIMMEL BC., BALLARD WW., KIMMEL RS., ULLMANN B., SCHILLING FT. (1995): Stages of Embryonic Development of the Zebrafish. *Developmental Dynamics* 203(3): 253-310.
- KISS I. (1997): Toxikológai. Veszprémi Egyetemi Kiadó, Veszprém, 95-117. p.
- KÜMMERER K., HEMPEL M. (2010): Green and Sustainable Pharmacy.
- LONGLEY BD., JOHNSTON PG. (2007): 5-Fluorouracil, Molecular Mechanism of Cell Death. *SpringerLink Molecular Mechanism* (2):263-278.
- NAGEL R., DAR T. (2002): The EmbryoTest with the Zebrafish *Danio rerio* – a General Model in Ecotoxicology and Toxicology, *Altex* 19, pp 38-48
- NOORDHUIS P., HOLWERDA U., VAN DER WILT CL., VAN GROENINGEN CJ., SMID K., MEIJER S., PINEDO HM., PETERS GJ. (2004): 5-Fluorouracil incorporation into RNA and DNA in relation to thymidylate synthase inhibition of human colorectal cancers 15(7):1025-32.
- PAGANELLI A., GNAZZO V., ACOSTA H., LÓPEZ SL., CARRASCO AE. (2010): Glyphosate-Based Herbicides Produce Teratogenic Effects on Vertebrates by Impairing Retinoic Acid Signaling. *Chem Res Toxicol.* 23(10):1586-1595.
- STRAUB JO. (2009): Combined Environmental Risk Assessment for 5-Fluorouracil and Capecitabine in Europe. *Integrated Environmental Assessment and Management* 36 (1): 540-566.
- Khetan SK, & Collins TJ. (2007): Human Pharmaceuticals in the Aquatic Environment: A Challenge to Green Chemistry. *Chem. Rev.* 107(6): 2319-2364
- VARGESSON N. (2009): Thalidomide-induced limb defects: resolving a 50 years-old puzzle. *BioEssays* 31(12):1327–1336.
- WEDEKIND C., VON SIEBENTHAL B., GINGOLD R. (2007): The weaker points of fish acute toxicity tests and how tests on embryos can solve some issues. *ScienceDirect.* 148(2):385-9.
- WESTERFIELD M. (2000). The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*). 4th ed., Univ. Of Oregon Press, Eugene
- WHARF C. (2007): XELODA. Európai Nyilvános Értékelő Jelentés (EMA/H/C/361)
- WHARF C. (2012): Capecitabine Krka. Európai Nyilvános Értékelő Jelentés (EMA/H/C/002605)

WICKRAMASINGHE SN., FIDA S. (1994): Bone marrow cells from vitamin B12- and folate-deficient patients misincorporate uracil into DNA. Blood 83(6):1656-61.

YANG L., HO NY., ALSHUT R., LEGRADI J., WEISS C., REISCHL M., MIKUT R., LIEBEL U., MÜLLER F., STRÄHLE U. (2009): Zebrafish embryos as models for embryotoxic and teratological effects of chemicals. Reproductive Toxicology 28(2):245-53.

ZHANG N., YIN Y., XU SJ., CHEN WS. (2008): 5-Fluorouracil: mechanisms of resistance and reversal strategies. Molecules 13(8):1551-69.

ZOUNKOVA R., KOVALOVA L., BLAHA L., DOTT W. (2010): Ecotoxicity and genotoxicity assessment of cytotoxic antineoplastic drugs and their metabolites. Chemosphere 81(2): 253-260.

Nem nevesített irodalom:

20/2005. (VI. 10.) EüM rendelet - a humán gyógyszerek és csomagolásuk hulladékainak kezeléséről

CytoThreat (2011): Fate and effects of cytostatic pharmaceuticals in the environment and the identification of biomarkers for an improved risk assessment on environmental exposure. FP7-ENV-2010 Deliverable Report.

EPA (2004): Pesticides Industry Sales and Usage, 2000 and 2001 Market Estimates

EPA (2011): Pesticides Industry Sales and Usage, 2006 and 2007 Market Estimates

Mezőgazdasági Szakigazgatási Hivatal Központ Növényi, Talaji és Agrárkörnyezet – Védelmi Igazgatóság (MgSzH) (2008): Növényvédőszer-maradék vizsgálati eredmények növénytermékekben, feldolgozott növény alapú élelmiszerekben és környezetvédelmi mintákban.

OECD 210 Guideline for testing of chemicals: Fish, Early-life Satge Toxicity Test (Adopted: 17.07.92)

OECD Draft Guideline for testing of chemicals: Draft Proposal For a New Guidance, Fish Embryo Toxicity (FET) Test. (2006, 1st version).

WHO (2003): Concise International Chemical Assessment Document 55, Polychlorinated Biphenils: Human Health Aspects. 35.o.

WHO (2004): Glyphosate and AMPA in Drinking-water, Summary statement Extract form Chapter 12 – Chemical fact sheets of WHO Guidelines for Drinking-water Quality, 3rd edition, 2004.(WHO/SDE/WSH/03.04/97)

Internet hivatkozások:

http1: Heidi Ledford (11 May 2009): How thalidomide makes its mark.

<http://www.nature.com/news/2009/090511/full/news.2009.462.html>

http2: Hírközpont Kormányzati Portál: Egészségügyi miniszteri rendelet a fel nem használt gyógyszerek kezeléséről és megsemmisítéséről (2012. szeptember 11.)

<https://hirkozpont.magyarorszag.hu/sajtokozlomenyek/eum20050610.html>

http3: A daganatképződés molekuláris biológiája (2012. október 6.) <http://www.szote.u-szeged.hu/mdbio/hun/hunold/anyagok/2008-2009/2.%20felev/8/23MAGY~1.pdf>

http4: Dr. Horváth B. Kemoterápia: mérgez vagy gyógyít? (2012. augusztus 22.)

<http://www.webbeteg.hu/cikkek/daganat/4671/a-kemoterapia>

http5: Az állati sejt szerveződése, Citoszkeleton (2012. október 6.): <http://phys.bio.u-szeged.hu/DT/szervezettan/ch02s06.html>

http6: Szentirmai Z. (1996): A daganatok patológiája. Háziiorvosi Továbbképző Szemle 1: 6-9 (2012. október 6.) <http://sunrise.sote.hu/htsz/szentirm.htm>

http7: WHO Collaboration Center for Drug Statistics Methodology (ATC/DDD Index 2012):

http://www.whocc.no/atc_ddd_index/

http8: Danio rerio (2012. szeptember 6.): <http://www.iucnredlist.org/details/166487/0>

http9: Danio rerio (2012. szeptember 6.):

<http://www.fishbase.org/Summary/SpeciesSummary.php?ID=4653>

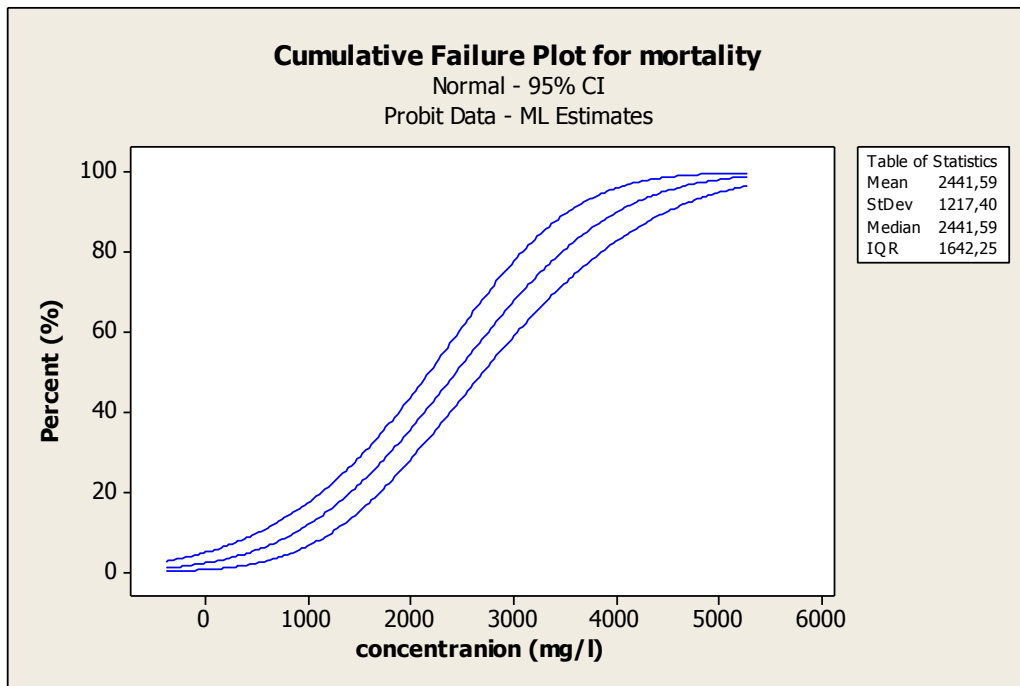
http10: The Zebrafish Model Organism Database (ZFIN) – Wild-type line AB (2012. szeptember 16.): <http://zfin.org/ZDB-GENO-960809-7>

http11: <http://kockazatos.hu/>

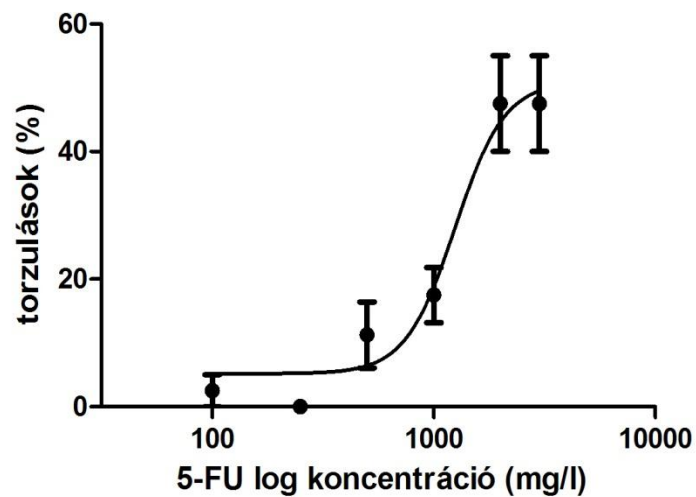
http12: SUBSTANCE PROFILES FOR THE PERSISTENT ORGANIC POLLUTANTS

<http://www.chem.unep.ch/pops/indxhtmls/asses6.html#DDT>

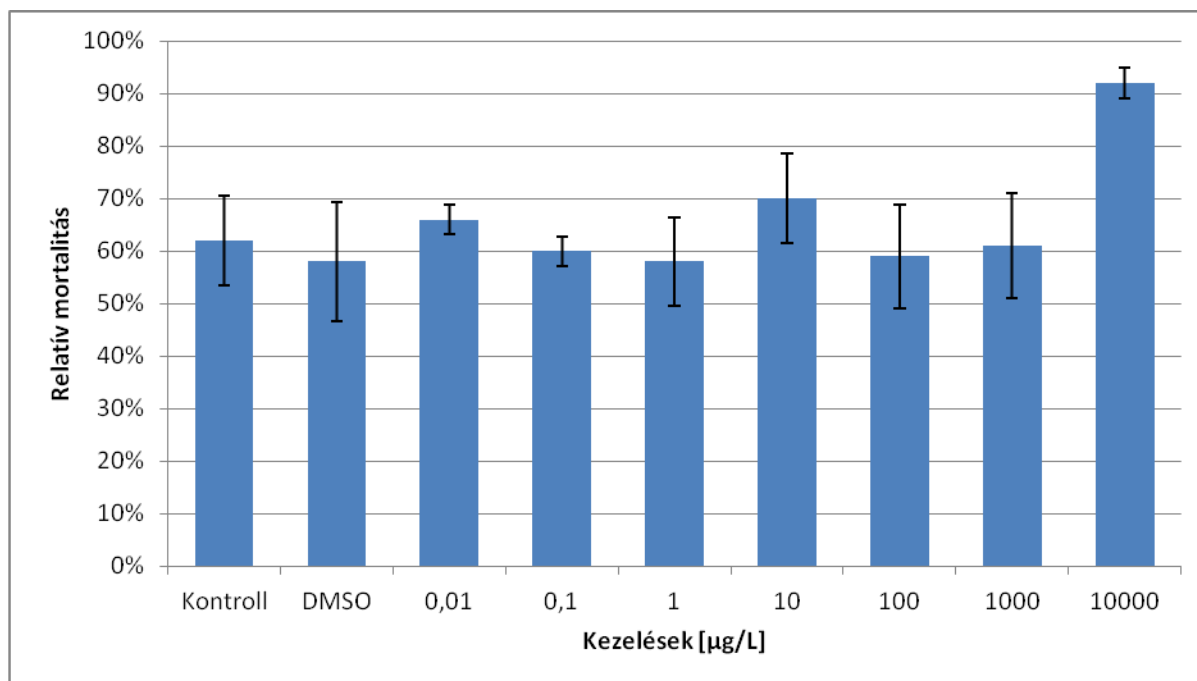
9 Mellékletek



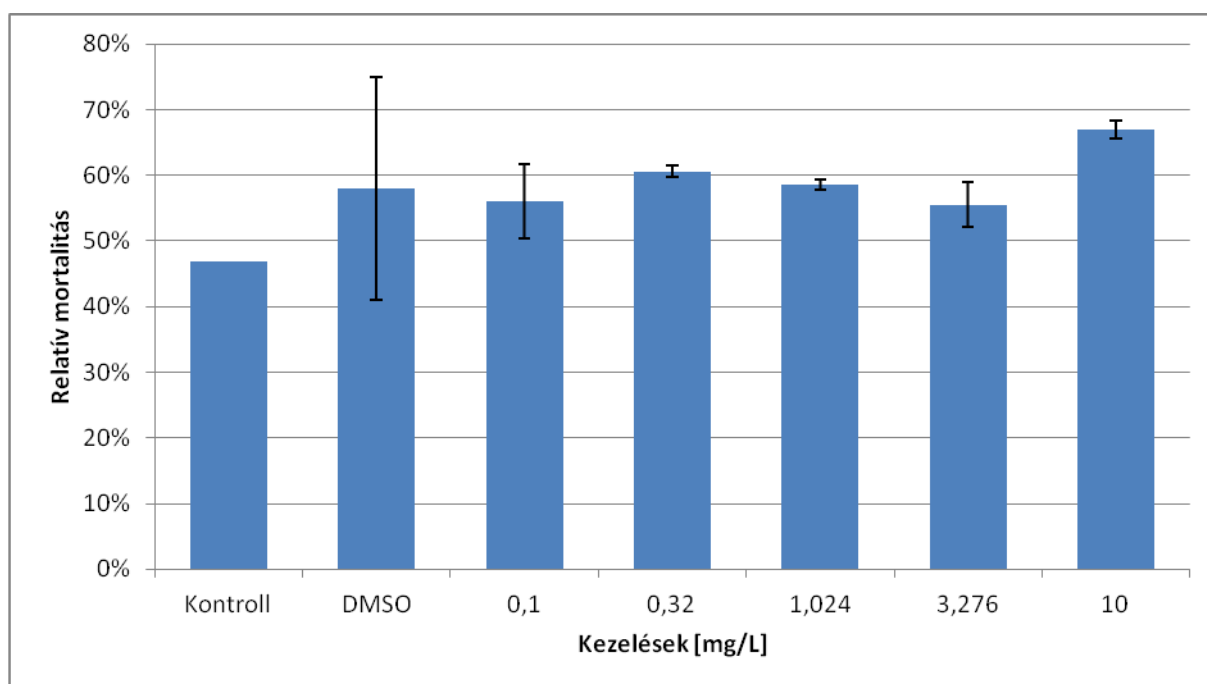
9.1. ábra Az 5-FU kumulatív mortalitási görbéje zebradánió embriók esetében



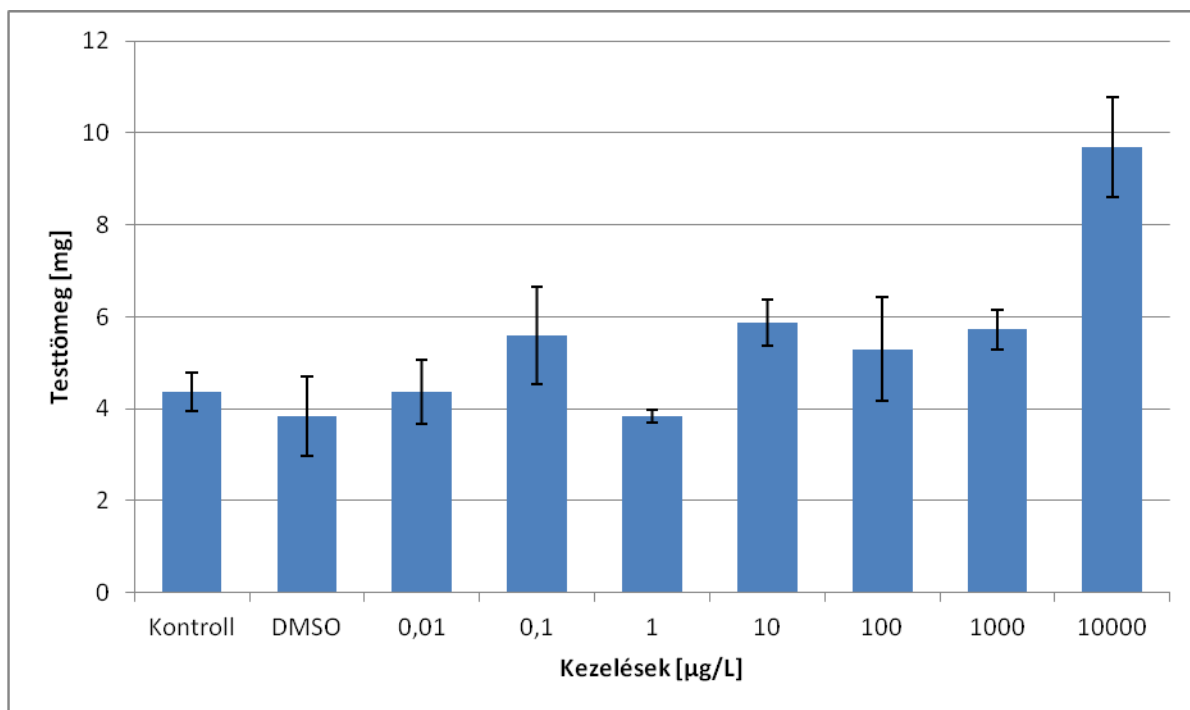
9.2. ábra Az akut kezelés esetében a torzulások alakulása koncentrációk függvényében



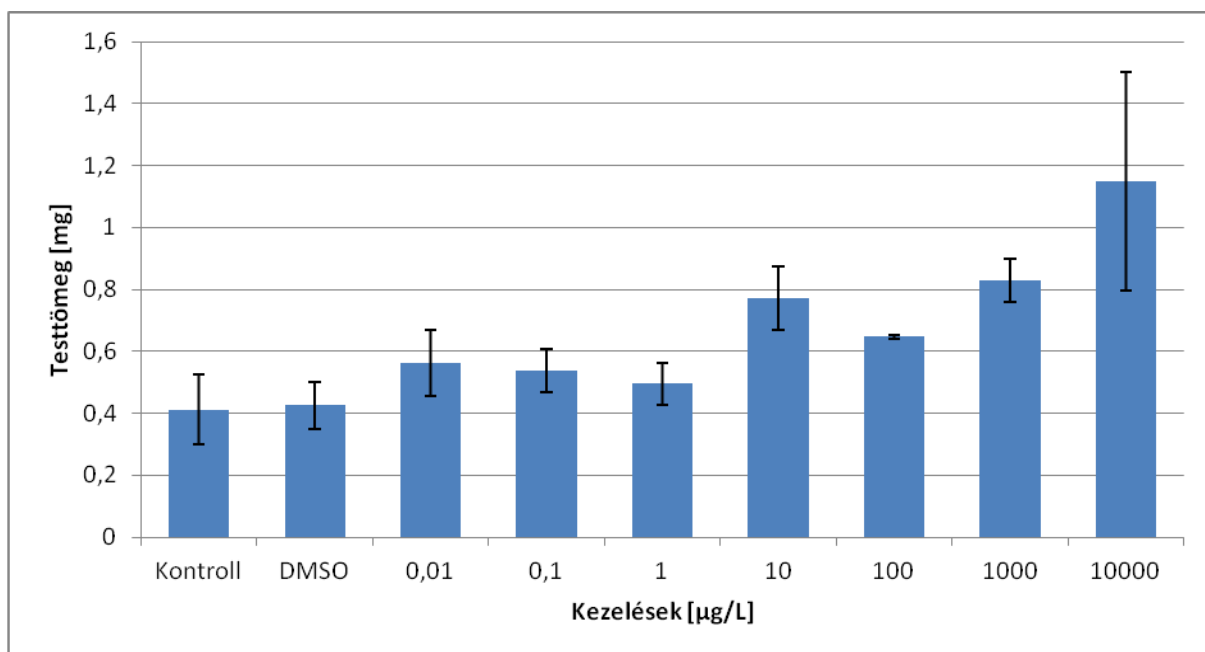
9.3. ábra Relatív mortalitás mértéke az egyes csoportokban szórással, az első kísérletben



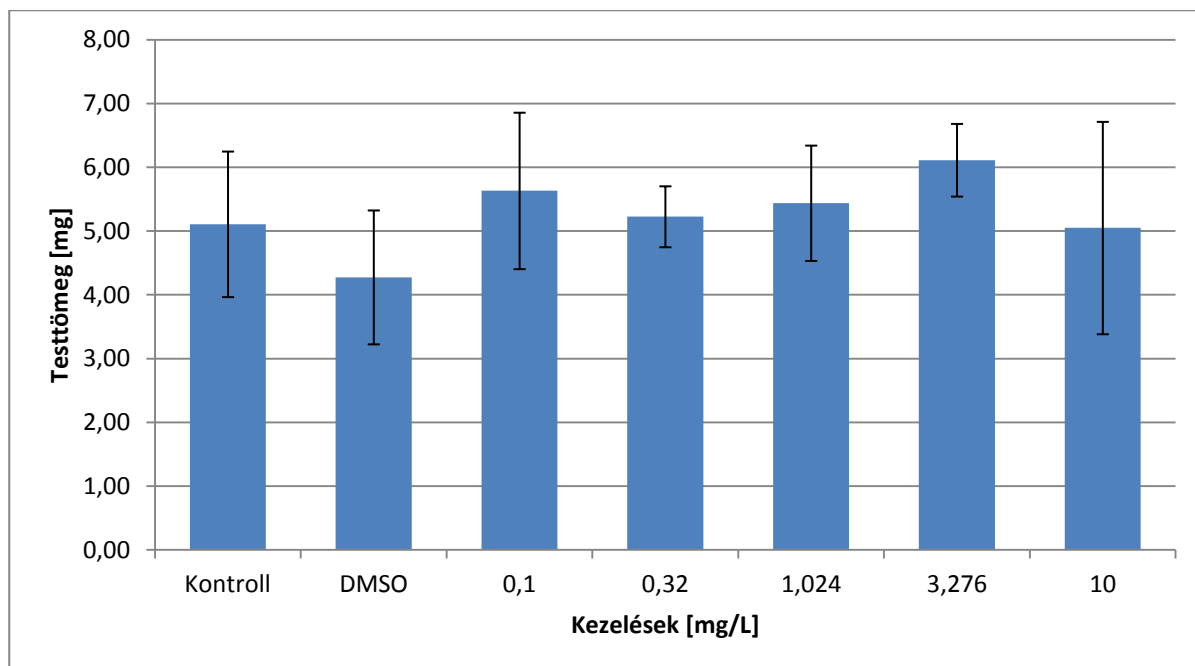
9.4. ábra Relatív mortalitás mértéke az egyes csoportokban szórással, a második kísérletben



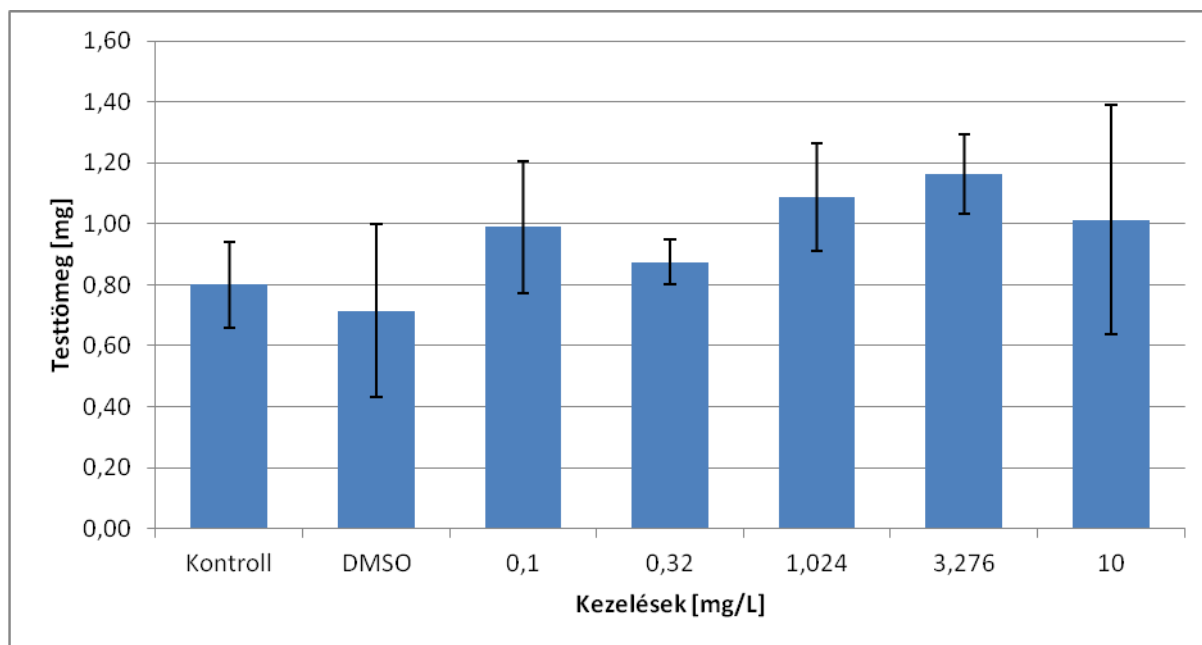
9.5. ábra Átlagos nedves tömeg mérési eredményei szórással az első kísérletben



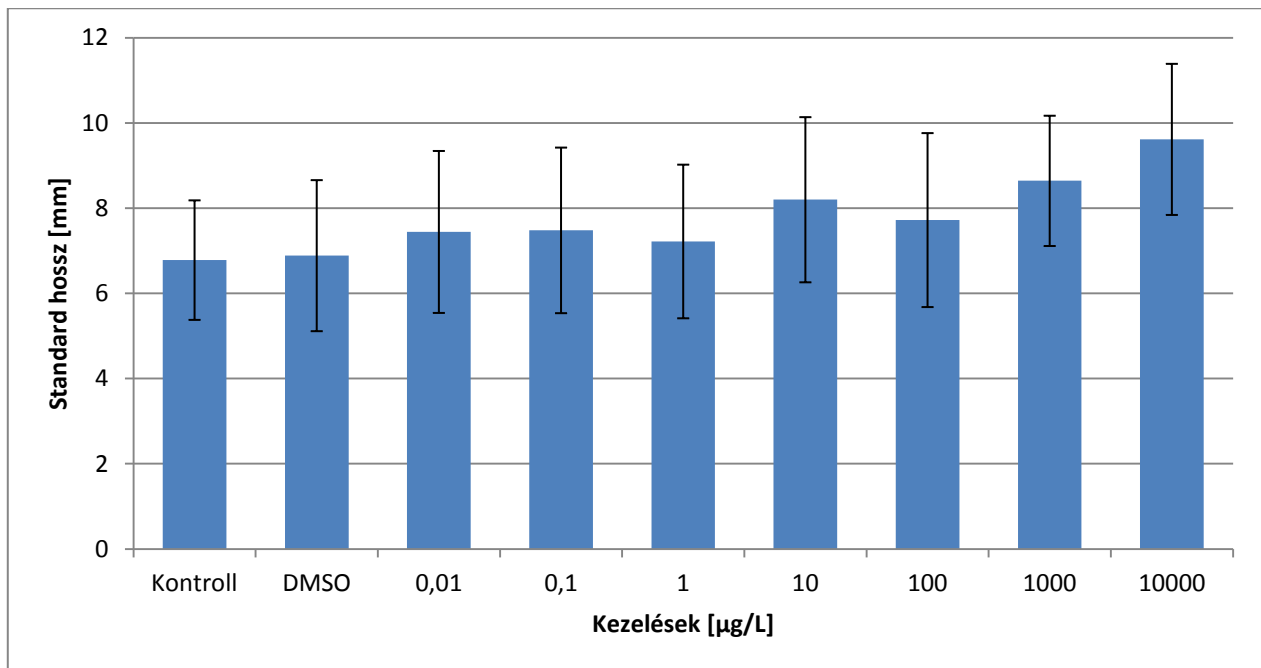
9.6. ábra Átlagos száraz tömeg mérési eredményei szórással az első kísérletben



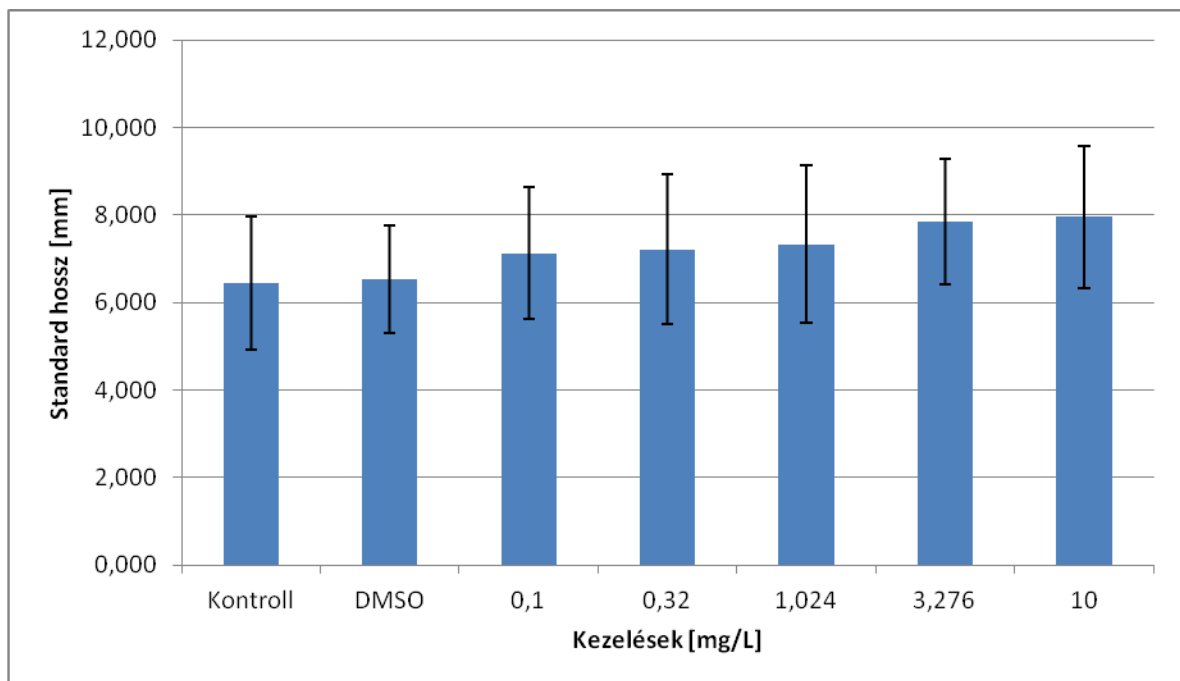
9.7. ábra Átlagos nedves tömeg mérési eredményei szórással a második kísérletben



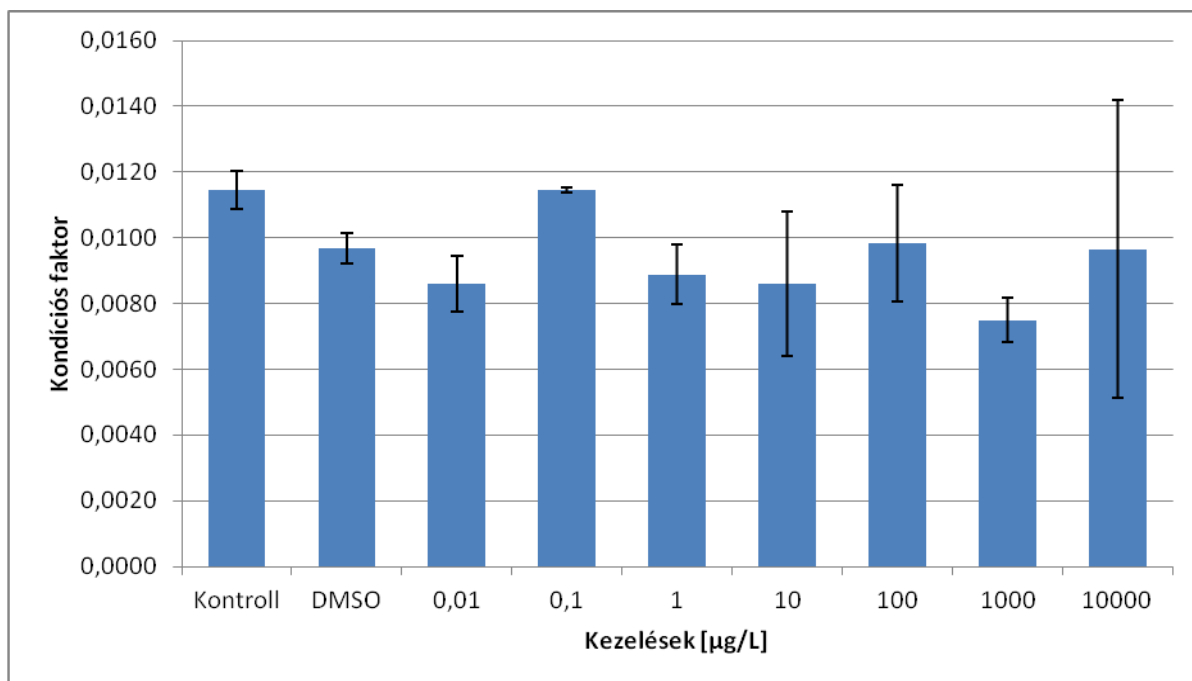
9.8. ábra Átlagos száraz tömeg mérési eredményei szórással a második kísérletben



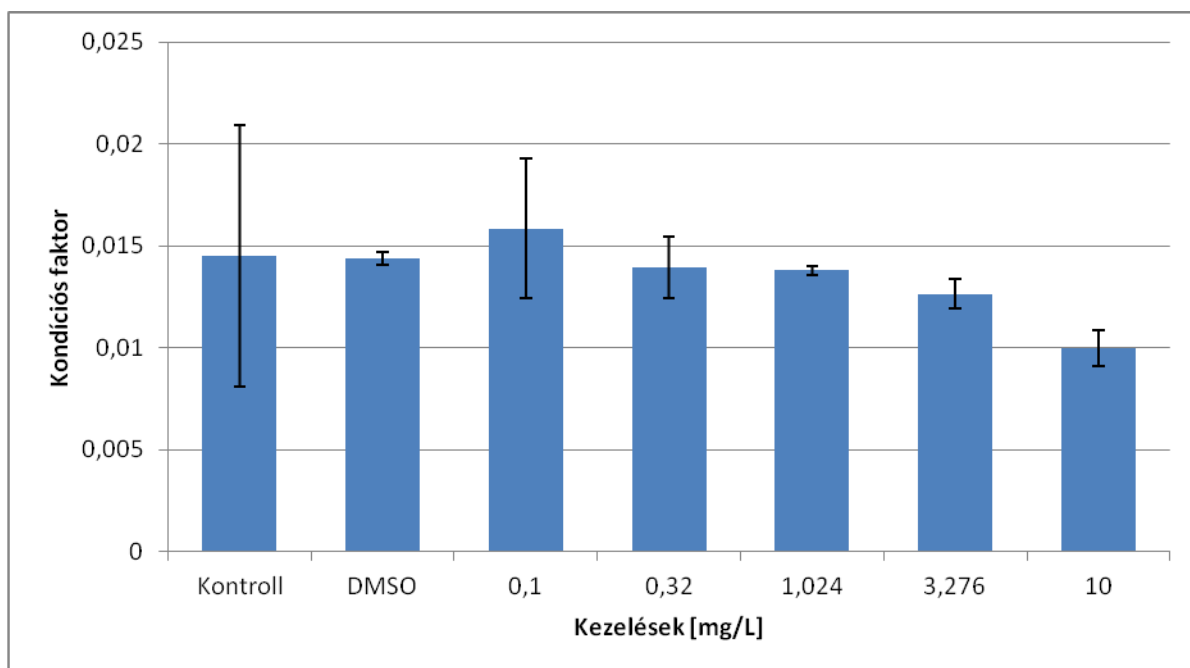
9.9. ábra Halak standard testhossza szórással a kísérlet lebontásakor az első kísérletben



9.10. ábra Halak standard testhossza szórással a kísérlet lebontásakor az második kísérletben



9.11. ábra Átlagos kondíciós faktor az első kísérletben szórással



9.12. ábra Átlagos kondíciós faktor az első kísérletben szórással

10 Nyilatkozat

Kijelentem, hogy a dolgozat teljes egészében saját munkám, a felhasznált irodalmat lelkiismeretesen, korrekt módon kezeltem, a munkára vonatkozó jogszabályokat betartottam.

.....

Tarcai Zsolt