

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

**EMBRIÓTOXICITÁS VIZSGÁLATA ÉS KÉT GENOTOXICITÁST VIZSGÁLÓ
MÓDSZER ÖSSZEVETÉSE A 4-ETIL-BENZALDEHID PÉLDÁJÁN**

Készítette: Kanizsai Barbara
Ökotoxikológus MSc

Konzulensek:
Csenki-Bakos Katalin
tanszéki mérnök
Bencsik Dóra
PhD hallgató

XXXII. Országos Tudományos Diákköri Konferencia
Biológia Szekció
Pécs
2015.

1. Bevezetés

1.1. Bevezetés és célkitűzés

A víz a földi lét alapja, az emberiség fejlődésének mozgatórugója. Talán pont a nagymértékű fejlődésnek, iparosodásnak köszönhetően egyre nehezebb megfelelő minőségű és mennyiségű ivóvízhez jutni. Számos, a mezőgazdaságból, az iparból és a háztartásokból származó szennyezőanyag található meg ivóvíz bázisunkban. Egy részükről bebizonyosodott, hogy hormonrendszert zavaró, mutagén vagy éppen karcinogén hatásúak. Az ivóvízben található, napjainkban még kevéssé vizsgált szennyezők a víztisztítási melléktermékek. Ezen vegyületek az ivóvíz fertőtlenítése során keletkeznek, egyes publikációk több százra becsülik a számukat. Mivel egyre több szennyező létezésére derül fény, ezért egyre fontosabbá válik a vizek minőségének ellenőrzése. Csupán kémiai vizsgálatokkal nem lehet felmérni az egyes vegyületek hatását, így egyre jobban előtérbe kerülnek a biológiai tesztek. A biológiai tesztekben különböző modellszervezeteket használnak, melyek közül a halak, mint az egyetlen kizárólag vízben élő gerinces csoport, kedvelt modellszervezetei a toxikológiai vizsgálatoknak. Az egyik leggyakrabban használt modellfaj a zebradánió (*Danio rerio*), mely könnyen tartható laboratóriumi körülmények között. Az embriók fejlődése átlátszó ikrahéjnak köszönhetően jól nyomon követhető, ez fontos szempont volt számunkra az embriókra gyakorolt toxicitás vizsgálatához.

Célkitűzésünk az volt, hogy információt kapjunk egy víztisztítási melléktermék vegyület, a 4-etil-benzaldehid halembriókra gyakorolt hatásáról. Ezen vizsgálat eredményeire alapozva további célunk volt két, a genotoxicitás kimutatására alkalmas módszer, a Comet assay és a RAPD alkalmazhatóságának, érzékenységének összehasonlítása, valamint rutinszerű alkalmazásuk lehetőségének feltérképezése.

1.2. Az ivóvíz és ivóvíztisztítási technológiák

1.2.1. Az ivóvíz

Ivóvíznek azt a vizet tekintjük, amely minőségileg alkalmas a szervezet számára, azaz veszélytelen és kellemes ízű. Ezeket az ENSZ által elfogadott kritériumokat az országok lehetőségeikhez mérten alkalmazzák ([http1](http://1)). Az előírások szerint tehát az ivóvíznek a következő tulajdonságokkal kell rendelkeznie: színtelen, szagtalan, kellemes ízű, kellemes hőfokú (10-14 °C), ne legyen sem túl lágy, sem túl kemény, továbbá ne tartalmazzon az egészségre káros szennyező, fertőző anyagokat. Magyarországon az OKI (Országos Környezetegészségügyi Intézet) és a NÉBIH (Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal) felelős a közfogyasztású ivóvizek vizsgálatáért és ellenőrzéséért. A főzésre, mosogatásra,

fürdésre szolgáló vízre ugyanazok az előírások vonatkoznak, mint az ivóvízre ([http2](#)). Az édesvizek sokféle oldott anyagot tartalmaznak, főleg sókat, gázokat, szerves anyagokat, valamint mikroorganizmusokat ([http1](#)). A jó ivóvíz tartalmaz valamennyi oldott kalciumot, magnéziumot és más sókat. Az oldott magnézium és kalcium mennyisége határozza meg a víz keménységét, melyet hazánkban német keménységi fokokban (nko) mérnek ([http3](#)).

1.2.2. Ivóvíztisztítási technológiák

A jó minőségű, káros szennyezőanyagoktól, mikroorganizmusoktól mentes ivóvíz biztosítása világszerte fontos feladat. Az ivóvizek kezelésénél alkalmazott technológiák többféle folyamat összességét jelentik: fizikai, fizikai-kémiai, kolloid-kémiai, biokémiai, mikrobiológiai folyamatokét. Ahhoz, hogy a vízben jelenlévő bizonyos anyagokat eltávolítsunk vagy a mikroorganizmusok mennyiségét csökkentjük, olyan megfelelő technológiák alkalmazása szükséges, amelyeket hat alapfolyamat (oxidáció-redukció, pH és pufferkapacitás szabályozása, kémiai kicsapás, fázisszétválasztás, adszorpció, egyéb folyamatok például membránfolyamatok) adott sorrendű összekapcsolásával, vagy ismétlésével végeznek el ([http4](#)).

Az ivóvíz kezelése során a legfontosabb lépés a fertőtlenítés. Célja adott határérték alá csökkenteni a mikroorganizmusok számát. A fertőtlenítőszerrel szembeni követelmények: kis mennyiségben is legyen hatékony a kórokozók elpusztításában, hosszú távon érvényesüljön a hatása, lehetőleg ne képződjön a vízminőségre károsan ható melléktermék, csak a mikroorganizmusokkal lépjen kémiai reakcióba. A fertőtlenítési módszerek közé tartozik a klórozás, klór-dioxidos, klóraminos, ózonos és UV-fénnyel történő fertőtlenítés. A kezelést tehát valamilyen fertőtlenítőszerrel, illetve oxidáció alkalmazásával hajtják végre (kivéve az UV-fényes fertőtlenítést, ahol fizikai úton zajlik a hatástalanítás) ([http4](#)). Hagyományos kezelésekkel kombinálva, mint például a koaguláció, flokkuláció, szedimentáció és filtráció, jó eredményeket értek el. Az ózonozás és a klórozás okozhatja az oldott szerves anyag flokkulációját, így növelheti a zavarosságot és a filtráció szükségességét. A fertőtlenítés hatékonyságát indikátor szervezetek (coliform baktériumok) elemzésével lehet megítélni. Ez a szervezet ártalmatlannak tekinthető, de jelenléte jelzi, hogy maradhattak kórokozók. A fertőtlenítésnek két lépése van: az elsődleges fertőtlenítés során a mikroorganizmusokat a megengedett számúra szorítják vissza vagy teljes mértékben inaktíválják, míg a másodlagos fertőtlenítés során a fertőtlenítőszer bizonyos szintjét még fenntartják a kezelt vízben, hogy megakadályozzák a mikroorganizmusok újranövekedését ([http5](#)). A legelterjedtebb fertőtlenítési módszer a klórozás, amelyet már a 20. század eleje óta

használnak. Alkalmazása egyszerű és viszonylag olcsó, a klór hatékony fertőtlenítőszer a baktériumok, vírusok és más kórokozó organizmusok széles körével szemben (Paull & Barron 2004). A módszer fő hátránya többek között a toxikus melléktermékek keletkezése, a szigorú biztonsági előírások miatt a fertőtlenítési költségek 20-30%-kal is növekedhetnek. A klór-dioxid alkalmazható a klór alternatívájaként. A spórákat és a cisztákat jól inaktíválja. Fontos tényező, hogy csíraölő hatékonyságát az ammónia jelenléte nem befolyásolja, így nagy ammóniumion koncentrációjú vagy nagy szerves anyag tartalmú vizek kezelésére is használható (Lazarova et al. 1999). A klóramin kevésbé hatékony a mikroorganizmusok elpusztításában, viszont megfelelő arra, hogy az egyedszámukat alacsony szinten tartsa, mivel fertőtlenítő képességét sokáig megőrzi. Hátrányaként említhető, hogy kellemetlen szagot kölcsönöz a víznek (http4). Az ózon egy igen erős oxidálószer, így az ózonozás nagy előnye, hogy igen magas fertőtlenítő hatással rendelkezik mindenféle kórokozóval (baktériumok, vírusok) szemben (Lazarova et al. 1999). Továbbá hatékonyan oxidálja a vasat, mangánt, arzént, szerves anyagokat. Hátránya viszont, hogy gyorsan bomlik a vízben, ezért alkalmazását követően másodlagos fertőtlenítést is kell végezni. Az ultraibolya sugárzással történő fertőtlenítés igen hatékony, könnyen elérhető módszer, nem termel ismert toxikus maradékokat, rövid kontaktidő esetén is jól működik, könnyű a berendezés kezelése és karbantartása (http5). Fertőtlenítő hatását azonban csak pár centiméteres vízrétegben képes megfelelően kifejteni. Alkalmazása során csak a sugárzás ideje alatt fejti ki a hatását, így a mikroorganizmusok elszaporodását később nem tudja meggátolni. Ezért ivóvíz fertőtlenítésére más szerekkel kombinálva alkalmazható, hasonlóan az ózonhoz és a klóraminhoz (http4). A membrántechnológiák biztosítják a kiváló vízminőséget és nagy megbízhatósággal a teljes fertőtlenítést is, amely fizikai úton történik (Lazarova et al. 1999). Léteznek még egyéb eljárások is, ilyen például az ezüstionok vagy a kálium-permanganát használata fertőtlenítésre (http4).

1.3. Tisztítás után megmaradó melléktermékek

1.3.1. A melléktermékek bemutatása

Az ivóvíz fertőtlenítése jelentős javulást jelentett a lakosság egészségi állapotában, mióta bevezették a fejlett országokban a 20. század első felében. Lassan 40 éve, hogy Rook és munkatársai (1974) felfedezték, hogy a klórozási folyamat részeként kis mennyiségben melléktermékek képződnek. Ezek a fertőtlenítési melléktermékek (*DBPs: Disinfection by-products*) a vízfertőtlenítés során akkor jönnek létre, amikor a természetes szerves anyagok, a bromidok és jodidok a vízben reagálnak a klórral, klór-dioxiddal, klóraminokkal és/vagy az

ózonnal. Kialakulásuk és előfordulásuk számos tényezőtől függ, beleértve a fertőtlenítőszer típusokat és dózisokat, a kezelés típusait, a pH-t, a hőmérsékletet, a fertőtlenítőszer kontaktidejét, a vízforrást, illetve a természetes szerves anyagok, bromid és jodid szintek mennyiségét és jellegét (Nieuwenhuijsen et al. 2009). A szakirodalomban már több mint 700 fertőtlenítési mellékterméket írtak le (Rácz et al. 2012). Ezek az anyagok fizikai és kémiai tulajdonságaikban jelentősen eltérnek. A melléktermékek különböző keverékek formájában is előfordulhatnak a korábban említett tényezőktől függően (Nieuwenhuijsen et al. 2009). A trihalometánok (THM), mint például a bromoform, a bróm-diklórmétán vagy a klór-dibrómmétán, a melléktermékek klórozás során kialakuló leggyakoribb csoportja (Boorman et al. 1999). Ezek az illékony melléktermékek nem csupán a lenyelés útján kerülhetnek a szervezetbe, hanem belégzés és bőrön át történő felszívódás útján is, zuhanyzást, úszást vagy fürdést követően. A nem illékony DBP-k, mint például a haloecetsavak (HAAs), esetében úgy gondolják, a lenyelés a fő expozíciós út. Ezen DBP-k bőrön át történő adszorpcióját is vizsgálták már (Nieuwenhuijsen et al. 2009). Egy epidemiológiai tanulmányban Villanueva és munkatársai (2007) azt találták, hogy a DBP-k a zuhanyzás, fürdés és úszás során bejutva növelik a húgyhólyagrák kialakulásának esélyét (Villanueva et al. 2007). A haloecetsavak szintén a klórozás során keletkező melléktermékek, ide tartozik például a diklóracetát, a triklóracetát, a dibrómacetát is. Továbbá a klórozás során keletkeznek még haloeketonok és egyéb melléktermékek, mint például a klorát, bróm-cián. Az ózonozás, klór-dioxid és a klóramin alkalmazásakor képződő melléktermékek közé tartoznak többek között az aldehidek, brómozott termékek (például bromát, bromoform), klorit, klorát, klórcián és bróm-cián (Boorman et al. 1999).

1.3.2. Egészségügyi hatások, veszélyek

A DBP-k jelenléte az ivóvízben és annak egészségügyi hatásai már az 1970-es évek óta ismertek. A klórozási melléktermékek és a húgyhólyagrák relatív kockázatának növekedése közti összefüggést epidemiológiai bizonyítékok támasztják alá, azonban a kockázat eltérő lehet például a dohányzók és nemdohányzók, férfiak és nők körében, illetve alacsony vagy magas vízfogyasztás esetén. Más rákos megbetegedések (például végbélrák, tüdőrák) esetében kevés bizonyíték és tanulmány áll rendelkezésre az összefüggésről. A legtöbb tanulmány általában a teljes trihalometánokkal (TTHM) foglalkozik, miközben egyes DBP-k, toxikusabbnak tűnnek a trihalometánoknál (Nieuwenhuijsen et al. 2009).

Plewa és munkatársai (2008) megállapították, hogy általánosságban a brómozott DBP-k erősebb genotoxikus és karcinogén hatással rendelkeznek, mint a klórozott vegyületek, illetve

a jódozott DBP-k bizonyultak a leginkább genotoxikusnak. Továbbá azt találták, hogy bizonyos nitrogéntartalmú DBP-k genotoxikusabbak, mint a szabályozás alá eső, széntartalmú DBP-k (például a trihalometánok és a haloecetsavak) (Plewa et al. 2008). Toxikológiai vizsgálatok több DBP esetében (például: 3-klór-4-(diklór-metil)-5-hidroxi-2-(5H)-furanon (MX) és a formaldehid) is kimutatták, hogy potenciális rákkeltők (Richardson et al. 2007).

A szakirodalom bőségesen foglalkozik azzal, hogy az anyában zajló oxidatív stresszfolyamatok a terhesség alatt fontos szerepet játszhatnak a magzat kóros fejlődésében. Egyes tanulmányok bizonyították, hogy a DBP-k oxidatív stresszt okozhatnak az emberi sejtekben (Nieuwenhuijsen et al. 2009). Beddowes és munkatársai (2003) egy *in vitro* vizsgálatban megállapították, hogy humán májkarcinóma sejtvonalban (HepG2) a növekvő kloroform dózis a glutation szint csökkenését eredményezte, amely oxidatív stresszt idéz elő (Beddowes et al. 2003).

Rácz és munkatársai (2004) az egyik budapesti vízműből kapott fertőtlenítési melléktermékek hatását vizsgálták, emberi perifériás limfocita sejtek túlélésére *in vitro* körülmények között. A szakirodalomban kevés adat áll rendelkezésre a DBP-k apoptózist indukáló hatásáról. A vizsgálatok azt mutatták, hogy a vízkoncentrátumok a fertőtlenítés után és érdekes módon előtte is koncentrációfüggő, jelentős apoptózist indukáló hatást váltottak ki emberi perifériás vérlimfocita tenyészetben. Felmerül a kérdés, hogy a mutagén és az apoptózist indukáló hatás a koncentrátumokban jelenlévő ugyanazon komponenseknek tulajdonítható-e? A vízkoncentrátum lehetséges karcinogén potenciálját, mutagén és apoptózist indukáló hatását még nem vizsgálták (Rácz et al. 2004).

1.3.3. A 4-etil-benzaldehid, mint vízfertőtlenítési melléktermék vizsgálata

A Fővárosi Vízművek által előállított ivóvízből eluált anyagok keverékének mutagén és apoptózist indukáló hatásait *in vitro* tesztekkel (Ames-teszt, humán limfocita tenyészet) már vizsgálták (Sujbert et al. 2006; Rácz et al. 2004). A kromatográfiás elemzés feltárta, hogy a keveréket több mint 200 jól meghatározott kémiai vegyület alkotja, amelyek közül valószínűleg számos anyag a szakirodalomban azonosított több mint 700 DBP között van. Számítógépes analízis segítségével meghatározták ezeknek a vegyületeknek a szerkezetét, a szakirodalomból kapott adatokból pedig kiderült, hogy 12 ilyen vegyületnek mutagén, karcinogén vagy más toxikus hatása lehet *in vitro*. Ezek közül két, kereskedelembe is beszerezhető vegyületet, a 2,4-difluoranilint (2,4-DFA) és a 4-etil-benzaldehidet (4-EBA) választották az *in vivo* vizsgálatok indításához, teszt szervezatként a zebrafishot (*Danio rerio*) alkalmazva (Rácz et al. 2012).

A benzaldehydekek a legegyszerűbb és legfontosabb aromás aldehidek, jellegzetes keserűmandula szagú, színtelen folyadékok. Vízi szervezetekre toxikus hatásúak (http6). A 4-etil-benzaldehyd (4-EBA) a benzaldehydekek egyik származéka, színtelen folyadék. Biztonsági adatlapja (Sigma-Aldrich) alapján fizikai, kémiai és toxikológiai tulajdonságait még nem vizsgálták mélyrehatóan (http7).

RácZ és munkatársai (2012) vizsgálatukban megállapították, hogy a 3 hónapos kezelés alatt (2 dózissal az akut toxicitás teszt alapján választva) a 4-EBA nem okozott májsejt megalocitózist, megváltozott hepatocitákból álló gócot, adenofibrózist vagy egyéb a karcinogén expozícióra jellemző elváltozásokat a zebradánió májában. Azonban a 4-EBA hatására a máj parenchyma sejtekben elváltozásokat figyeltek meg a relatív zsírtartalomban és zsíreloszlásban. A zsírsejtek változó méretűek, de a kísérlet időtartama alatt majdnem az egész citoplazmát kitöltötték. Továbbá a kontrollhoz viszonyítva a parenchyma sejtek glikogén tartalma csökkent. A nőstény és hím egyedekben egyaránt megfigyelhetőek voltak ezek az elváltozások. Eredményeik alapján úgy tűnik, hogy a 4-EBA nem okoz karcinogenitásra utaló preneoplasztikus léziókat. Azonban hosszantartó expozíció során elképzelhető, hogy a vegyületek karcinogén hatással is rendelkeznek (folyamatban lévő kísérletek). A 4-EBA a vesében, a májban és a kültakarón idő-és dózisfüggő módon sorvadásokat (disztrófiás elváltozásokat) okozott. Ezek az elváltozások nem specifikusak a vizsgált vegyületekre, de felhívták a figyelmet a lehetséges toxicitásra. A 4-EBA a szénhidrátok és zsírok anyagcseréjében is elváltozásokat okozott. A vizsgálat 3 hónapja alatt a halak letargikusak voltak mindkét 4-EBA-val kezelt csoportban, illetve bátrabbak voltak, nem kerültek az elfogást. A halak egyensúlyában vagy a függőleges orientációban nem volt megfigyelhető elváltozás. Az akut toxicitási tesztben a kifejlett zebradánió 4-EBA-ra meghatározott LC₅₀ értéke (lásd 1.4. fejezet) a kezelés 96. órájában 23,49 mg/l volt (RácZ et al. 2012).

1.4. Toxikológiai vizsgálatok

A toxikológia a kémiai, fizikai vagy biológiai ágensek élő szervezetekre, illetve ökoszisztémára gyakorolt káros hatásaival foglalkozó tudomány, amely a kémiai anyagok toxicitását, veszélyességét, a mérgezések klinikai, kórbonctani és terápiai jellemzőit is vizsgálja (Lehel & LacZay 2011). Szabályozások gyakran írják elő toxikológiai vizsgálatok rendszerét a különböző kémiai anyagok, élelmiszer adalékanyagok, növényvédő szerek, ipari vegyi anyagok vagy éppen ismeretlen hatású anyagok esetében a potenciális toxikológiai veszély megállapítására. A kapott információk lehetővé teszik a kormányzati szervek számára

annak megállapítását, hogy adott anyag előnyei meghaladják-e az emberi egészségre és/ vagy környezetre gyakorolt káros hatását (http8).

A toxikológiai vizsgálatokat úgy tervezik és végzik, hogy adatokat szolgáltatassanak az egyes anyagok emberi vagy állati egészségre, vagy környezetre gyakorolt káros hatásaival kapcsolatban. Számos toxicitási teszt kifejezetten egy adott hatás vizsgálatára alkalmazható, mint például a szem és bőr irritáció, mutagenitás vizsgálatok. Más vizsgálatok inkább általános jellegűek, céljuk széles körben felismerni a szervekre vagy szervrendszerekre ható kevésbé specifikus hatásokat, valamint azt a dózistartományt, amely felett a hatás kialakul. Vizsgálatsorozatok célja lehet az emberre ható veszélyek azonosítása, melyeket általában „biztonsági” vagy „egészségügyi hatás” vizsgálatként említene (http8; http9).

Ahhoz, hogy egy ismeretlen kémiai anyag környezetre, egészségre gyakorolt hatásáról minél pontosabb képet kapjunk, különböző modellszervezetekre van szükség. A fontosabb modellszervezetek közé tartoznak a baktériumok, algák, békalencse, vízibolha fajok, halak, kételtűek, hüllők, emlősök. Baktériumokat alkalmazó tesztek közé tartozik például a genotoxicitás kimutatására igen gyakran használt Ames-teszt (http10, OECD TG 471), de végeznek egyéb toxikológiai vizsgálatokat is, ahol a tesztorganizmus (*Aliivibrio fischerii*) biolumineszcenciájának csökkenése összefüggésben van a vizsgált anyag toxikusságával (Thouand 2011). A kémiai anyagok növényekre gyakorolt hatásának vizsgálatához gyakran alkalmazzák az alga növekedésgátlási tesztet (http11, OECD 201) vagy a békalencse (*Lemna* sp.) tesztet (http12, OECD221). Az alsóbbrendű állatok esetében végzett vizsgálatok igen fontosak, hiszen táplálékul szolgálnak más fajok számára. A leggyakrabban használt teszt a *Daphnia* sp. akut immobilizációs teszt (http 13, OECD 202). Ezen tesztek alkalmazása lehetővé teszi, hogy felmérjük adott anyag hatásait az alsóbbrendű élőlényekre.

A halak, mint az egyetlen kizárólag vízben élő gerinces csoport tagjai, a toxikológiai vizsgálatok kedvelt modellállatai. A halak rendelkeznek a legtöbb, emlősökben is megtalálható szövettípussal, kivéve a mell-, prosztata- és tüdőszövet. Az egyik legjobb szervezetek a vízi környezetet érintő veszélyek, terhelések vizsgálatához. A halak közül is az egyik leggyakrabban használt modellállat a zebradanió (*Danio rerio*) (bővebben 1.6.2. fejezet), mely számtalan előnnyel rendelkezik, beleértve az alacsonyabb tartási költségeket az emlősökhöz viszonyítva (Spitsbergen 2003).

A halakon végezhető OECD szabványok közé tartozik az hal akut toxicitási teszt (http14, OECD 203). A teszt során a halak 96 órán keresztül vannak kitéve a vizsgált anyagnak. Rögzítik a mortalitást a 24., 48., 72. és 96. órában, majd meghatározzák az LC₅₀ értékeket is.

Az LC_{50} érték az a koncentráció, amely a vizsgált egyedek felének elhullásához vezet. Koncentrációnként legalább 7 egyedet szükséges vizsgálni a tesztben (http14, OECD 203).

A halembrió akut toxicitási tesztben (http 15, OECD 236) a cél a vizsgált anyag akut toxicitásának meghatározása az embrionális fejlődési szakaszban zebradánián (*Danio rerio*). Egy 24 lyukú szövettenyésztő plate-be 20 embriót helyeznek (1 embrió/lyuk). A teszt időtartama 96 óra. Ennek során 24 óránként rögzítik a mortalitást, a megtermékenyített ikrák koagulációját, a szomita képződés hiányát, a farok szikról való leválásának hiányát, a szívverés hiányát, továbbá meghatározzák az LC_{50} értéket is tesztben (http 15, OECD 236).

A korai életszakasz toxicitás vizsgálat (http16, OECD 210) célja a kémiai anyagok letális és szubletális hatásainak meghatározása a tesztelt halfaj korai életszakaszában. Ezeket a hatásokat értékelik, összehasonlítják a kontrollal, meghatározzák a legkisebb megfigyelhető hatást okozó koncentrációt (LOEC), a megfigyelhető hatást nem okozó koncentrációt (NOEC) és az effektív koncentrációkat (EC_x) egy regressziós modell segítségével (http16, OECD 210).

Az embrión végzett rövid hatásidejű vizsgálat (http17, OECD 212) során halembriókat és hallárvékat kezelnek a vízben oldott tesztanyag különböző koncentrációival. Letális és szubletális hatásokat értékelnek összehasonlítva a kontroll értékekkel, hogy meghatározzák a legkisebb megfigyelhető hatást okozó koncentrációt (LOEC), továbbá a megfigyelhető hatást nem okozó koncentrációt (NOEC) (http17, OECD 212).

1.5. Genotoxicitás tesztek

1.5.1. Genotoxikológia, genotoxicitás

A genotoxikológia a toxikológia egyik ága, a vegyi anyagok DNS-re gyakorolt károsító hatását vizsgálja, továbbá feladata az emberrel közvetlenül kapcsolatba kerülő mutagén anyagok hatásának felderítése is. A genotoxikus anyagok olyan vegyületek, amelyek tartósan megváltoztatják a DNS-ben tárolt genetikai információt, így az örökölt tulajdonságok megváltozását idézhetik elő. Ide tartoznak még azok az anyagok, amelyek a javító mechanizmusokra hatnak, azokat gátolják (Szilágyi 2005). A genotoxicitás háromféle típusú elváltozást eredményezhet az örökítőanyagban. Az úgynevezett pontmutációk a DNS szekvencia egy nukleotidot érintő megváltozásai, amelyek során bázisok kicserélődnek, számuk megváltozik. A kromoszómák strukturális megváltozása során a kromoszómák töreése révén átrendeződik a genetikai információ, például deléción, inverzió vagy transzlokáció révén. A harmadik típus a kromoszómák számbeli változása (aneuploid, poliploid mutációk). Számos kémiai anyag válthat ki karcinogén hatást genetikai elváltozások indukálásán

keresztül. A karcinogéneket két csoportra oszthatjuk: genotoxikus karcinogének a DNS-t közvetlenül károsítják (például alkilező szerek, nehézfémek, policiklikus aromás szénhidrogének), az epigenetikus karcinogének pedig közvetett úton idézik elő a DNS-ben az elváltozásokat, például immunszuppresszió révén hatnak (Mohanty et al. 2011).

1.5.2. A genotoxikológiai vizsgálatok eszközei

Ha egy anyagról már rendelkezésre állnak általános toxikológiai információk, akkor a specifikusabb vizsgálatok felé lehet fordulni. A genotoxikus hatás pontos felderítéséhez vizsgálatok sorát kell elvégezni (egymásra épülő tesztek, különböző végpontok, különböző modellek). A genotoxicitás tesztek *in vivo* és *in vitro* is végezhetőek. A genotoxicitás mérésére többféle, nemzetközileg is elfogadott tesztrendszer létezik: bakteriális tesztek (*Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*), eukarióta egysejtűek (például *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus nidulans*), rovarok (ágascsapú rákok: *Daphnia sp.*, ecetmuslica: *Drosophila melanogaster*), gerinces sejtvonalak (humán és egyéb emlős sejtvonalak), növények (lóbab, árpa, vöröshagyma), *in vivo* (karmosbéka, halak, egér, hörcsög, patkány).

1.5.3. Néhány fontosabb genotoxicitás teszt bemutatása

A bakteriális reverz mutációs teszt (http10, OECD TG 471) vagyis az Ames-teszt igen népszerűnek mondható. Indukált mutációs hatások kimutatására irányuló vizsgálat, amelyben hagyományosan *Salmonella typhimurium* törzseket használnak, de *Escherichia coli* törzseket is alkalmazhatnak tesztorganizmusként. A módszer elve, hogy a hisztidin auxotróf baktérium törzsek nem képesek szaporodni olyan táptalajon, ami hisztidin hiányos. Ha a vizsgált anyag mutagén, akkor mutáció jöhet létre a hisztidin szintéziséért felelős génben, így a reverz génmutáció révén a sejtek képesek lesznek növekedni a minimál táptalajon. Minél több sejt mutálódik vissza, annál erősebb mutagén hatással rendelkezik a vizsgált anyag. A módszer a vegyületek mutagén tulajdonságának kimutatása mellett az esetleges karcinogén hatásról is információt ad. (http10, OECD TG 471; Lehel & Laczay 2011).

Az *in vitro* emlős kromoszóma aberrációs tesztben (http18, OECD TG 473) a vizsgálat célja azon anyagok meghatározása, amelyek szerkezeti kromoszóma aberrációt okoznak emlős szomatikus sejtenyészeten. Az ilyen típusú vizsgálatokban leggyakrabban humán limfocitákat vagy adott állati sejtvonalakat (gyakran aranyhörcsögből származik) alkalmaznak. A sejtosztódás serkentését követően a tenyészetet kezelik a vizsgált anyaggal (esetenként metabolikus aktivációt is alkalmazva), amely körülbelül 1,5 sejtciklus hosszúságú. Ezt követően meghatározott időpontban blokkolják (például kolhicinnel) a metafázist, majd preparátumot készítenek, megfestik, végül a metafázisos sejtekben

mikroszkóp segítségével vizsgálják a kromoszóma aberrációkat (például törések, transzlokációk) (http18, OECD TG 473).

Az *in vitro* génmutáció vizsgálat emlős sejteken (http19, OECD TG 476) használható a kémiai anyagok által előidézett génmutációk vizsgálatára, a lehetséges emlős mutagének és karcinogének szűrésére. A vizsgálandó vegyülettel kezelt sejtenyészetet az inkubációt, illetve a sejtosztódás felfüggesztését követően (vagy nélküle) megfestik, majd mikroszkóppal vizsgálják, hogy a kromoszóma-rendellenességek milyen gyakorisággal fordulnak elő (http19, OECD TG 476; Lehel & Laczay 2011).

Az emlős vörösvértest (eritrocita) mikronukleusz teszt (http 20, OECD TG 474) a vizsgált anyag kromoszómáját vagy az eritroblasztok mitotikus apparátusát károsító hatásának kimutatására alkalmazható. A minták leginkább csontvelőből vagy perifériás állati vérsejtekből, rendszerint rágszálókból (egér vagy patkány) származnak. A vizsgálat célja azon anyagok azonosítása, amelyek citogenetikai károsodást okoznak, ennek eredményeként mikronukleuszok képződnek. A mikronukleuszok számfeletti kromoszómából vagy kromoszómális törtvégekből származnak. Sejtmagként festődnek, mag mellett elkülönülten helyezkednek el, osztódáskor egyik utódsejtmagba sem integrálódnak. A kezelt állatokban a mikronukleált polikromatikus eritrociták számának növekedése jelzi a vizsgált anyag által indukált kromoszómakárosodást (http 20, OECD TG 474).

Az egér limfóma timidin-kináz (TK) vizsgálat része az *in vitro* vizsgálatok egy csoportjának, melyek célja a kockázatbecslés előrejelzése az *in vivo* vizsgálatokat megelőzően. Az eljárás során a timidin-kináz a timidin timidin-trifoszfáttá alakulását katalizálja. A TK mutáns sejtek rezisztensek a pirimidin analógokra. A TK+/- sejtek tesztanyaggal történő kezelése után, ha mutagén hatás jelentkezik, akkor a toxikus pirimidin analógot tartalmazó médiumban egyre több sejt él túl (TK-/-). Alkalmazható szubsztitúció, transzlokáció, delécio, génkonverzió detektálására (Lloyd & Kidd 2012).

A genotoxicitást vizsgáló tesztek közé tartoznak még többek között: *in vitro* SCE (*Sister Chromatid Exchange*-testvérkromatida kicserélődés) vizsgálat emlős sejteken (http21, OECD TG 479), *Saccharomyces cerevisiae* génmutációs vizsgálat (http22, OECD 480), *in vitro* emlős mikronukleusz teszt (http23, OECD 487), illetve alkalmazható a genotoxicitás vizsgálatokban a Comet Assay (lásd 1.7. fejezet) és a RAPD PCR (lásd 1.8. fejezet) módszer is.

1.6. A zebradánió

1.6.1. A faj jellemzése

A zebradánió fajt Francis Hamilton-Buchanan 1822-ben *Cyprinus rerio* néven írta le, majd később a *Danio* nemzetségbe került át. Rendszertani besorolása: állatok országa (Animalia), gerinchúrosok törzse (Chordata), sugarasúszójú halak osztálya (Actinopterygii), pontyalkatúak rendje (Cypriniformes), pontyfélék családja (Cyprinidae), *Danio* nem, zebradánió faj (*Danio rerio*).

Széles körben elterjedt, Indiában, Bangladesben, Nepálban is őshonos. (http24). Olajbarna hát, sárgásfehér has és oldalak jellemzik. Sötét acélkék sávok húzódnak a farok alatti úszón illetve a kopolyúfedőtől egészen a farokúszó végéig. Sárgásbarna kék szegélyes hátúszó jellemzi, mely kívülről fehér szegéllyel borított. Kék színű, fehér foltos kopolyúfedőjük van. A nőstény színei kevésbé intenzívek, alkata teltebb, míg a hímek karcsúbbak, aranysárga alapszínűek, sötétebb csíkozottságúak. Átlagos testhosszuk 4,5 cm (Horn 1983).

A felnőtt egyedek élőhelye a patakok, árkok, csatornák, tavak. Kisebb csoportokban élnek. Előfordulnak lassú mozgású pangó álló vizekben, különösen a rizsföldeken, ártereken. A felszínközeli vízrétegeket kedvelik. Férgekkel, kis rákokkal, rovarlárvákval táplálkoznak. Az ívási időszak a vadonban a monszunesők kezdetével esik egybe. Gyakran használják szünyogirtásra is. Népszerű akváriumai díszhal, illetve modellállatként is elterjedt. A zebradánió 6-8 közötti pH-jú vízben tartható, fogságban akár 3,5 évig is él (http25). Optimális tartási hőmérsékletnek az OECD203 szabvány 21-25 °C-os tartományt ad meg zebradánió esetében (http14, OECD 203).

A zebradánió embriófejlődése jól elkülöníthető stádiumokból áll, 7 nagy periódus különböztethető meg: 1. zigóta periódus, 2. barázdálódás, 3. hólyagsíra periódus, 4. gasztruláció, 5. szegmentáció, 6. pharyngula stádium, 7. kelés. A megtermékenyítést követően az ikrák már 3 nap múlva kikelnek (Kimmel et al. 1995).

1.6.2. A zebradánió, mint toxikológiai modellállat

A zebradánió az egyik legelterjedtebb modellállat több tudományterületen, ez elsősorban annak köszönhető, hogy a tartási körülményei más halfajokkal szemben egyszerűek, továbbá számtalan kutatási eredmény áll rendelkezésre a fajról. Ezt jól mutatja, hogy míg az 1990-es években alig 100 cikk jelent meg a fajjal kapcsolatos kutatásokról, addig 2005-re ez a szám már elérte a 3500-at. (Hill et al. 2005).

A tudományos kutatás számára a faj felfedezése a magyar származású Streisinger György nevéhez fűződik. Eleinte a fejlődésbiológiai kutatásokban használták, de ma már számos más tudományterületen elterjedt, többek között betegségek modellezésére vagy gyógyszer hatóanyagok vizsgálatára a humángyógyászatban. A biotechnológiai kutatások révén ismertté vált a zebradánió teljes genomi szekvenciája, illetve több mutáns vonalat hoztak létre (Csenki et al. 2006).

A zebradánió nagyon jó alany a toxikológiai kutatásokban, mivel morfológiai, fiziológiai és biokémiai jellemzői mindkét nem esetében rendelkezésre állnak a fejlődés korai szakaszában. Ennélfogva még inkább alkalmasak a különböző káros hatások által kiváltott rendellenességek értékelésére a toxikológiai vizsgálatokban (Hill et al. 2005). A zebradánió mellett más, az OECD által javasolt halfajokat is alkalmaznak, például (http14, OECD 203): medaka (*Orizias latipes*), szivárványos guppi (*Poecilia reticulata*), ponty (*Cyprinus carpio*), szivárványos pisztráng (*Oncorhynchus mykiss*), kékkopoltyús naphal (*Lepomis macrochirus*), tűzcselle (*Pimephales promelas*).

A zebradánió kis méretének, viszonylag egyszerű tenyésztetőségének köszönhetően nagyban csökkenti a tartási költségeket és helyszükségletet is. Számos cég szakosodott zebradániók tartására alkalmas akvárium rendszerek gyártására (Hill et al. 2005).

A zebradánió tehát laboratóriumi körülmények között is jól tartható csapathal, kis helyigényű, a víz kémiai összetételére és a táplálék minőségére nem igényes. A felnőtt egyedek néhány hónap alatt ivaréretté válnak, a nőstényektől hetente 200-300 ikraszem nyerhető. Az embriók fejlődése *ex utero* nyomon követhető, már 72 órával a megtermékenyülés után kikelnek, majd 2-3 nap múlva el is úsznak a lárvák (Csenki et al. 2006). Az embriók Petri-csészében vizsgálhatók, mely jelentősen csökkenti a vegyszerek felhasználását, kevesebb oldatra van szükség, mivel helytakarékos, így több párhuzamos teszt is futatható ugyanabban az időben. (Hill et al. 2005).

A halakon végzett tesztek igen nagy előnyének számít - ellentétben a költséges, időigényes és szigorú törvényi szabályozás alá eső rágcslókon végzett tesztekkel - hogy a halembriókon a nem táplálkozó lárvá előtti stádiumon végzett vizsgálat nem számít állatkísérletnek (Nagel 2002).

A zebradánió, mint modellfaj végtelen sok előnyös tulajdonsággal jellemezhető. Általánosságban elmondható, hogy egyetlen modellszervezet sem lehet megfelelő minden kutatás számára, de a zebradánió nagyon hasznos és ígéretes fajnak tekinthető, amely kiegészíti az egerekkel, patkányokkal, muslicákkal és egyéb fajokkal végzett kutatásokat. Van azonban egy elkerülhetetlen hátránya is: hogy 'új', így kevesebb szakirodalom áll

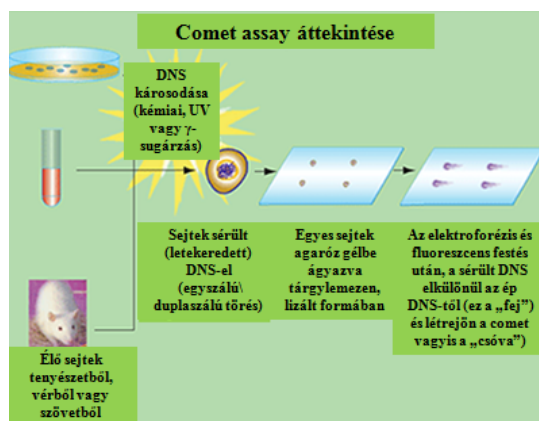
rendelkezésre a többi modellfajhoz képest. Bár a fejlődéséről sokat tudunk, viselkedését például még nem vizsgálták elég mélyrehatóan. Azonban számos laboratórium dolgozik azon, hogy ez változzon (http26).

Hátránynak tekinthető az is, hogy a faj genomja nehezíti az eredmények extrapolálhatóságát a magasabb rendű gerinces szervezetekre, mivel az emberi genomhoz képest 1 kromoszómapárral többet tartalmaz. Emiatt ugyanakkora anyagmennyiség zebhradánión kisebb elváltozásokat okozhat, míg az emlősök esetében letalitás következhet be (Hill et al. 2005).

1.7. Comet assay

1.7.1. A módszer bemutatása

A Comet assay (1. ábra) vagy más néven SCGE módszer (Single Cell Gel Electrophoresis assay) egy egyszerű és érzékeny technika, amely alkalmas a DNS károsodás kimutatására az eukarióta sejt szintjén (Tice et al. 2000). A mikrogél elektroforézis koncepcióját először 1984-ben Östling és Johanson (1984) mutatta be, mint az egyszálú DNS törések mérésére alkalmas módszert, majd később Singh és munkatársai (1988) módosították 1988-ban (Olive és Banáth 2006). Azóta népszerű standard módszerré vált a DNS károsodás/javítás értékelésében, a biomonitoringban és a genotoxicitás vizsgálatokban. A Comet assay során a sejteket alacsony olvadáspontú agaróz gélbe ágyazzák, majd semleges vagy lúgos ($\text{pH} > 13$) körülmények között lizálják (feltárják), és a sejteket elektroforézisnek vetik alá. Az elektroforézis során az eltoredezett DNS a károsodás mértékétől és a képződött fragmentek méretétől függően elvándorol a sejtmagtól. A „comet” vagyis „üstökös” kifejezés arra utal, hogy a DNS töredékek elmozdulása a gélben üstökösre hasonlít (Tice et al. 2000).



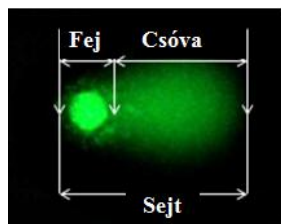
1. ábra: Comet assay módszer lépései (httpA)

1.7.2. A Comet assay módszer fejlődése

A DNS károsodását az egyes sejtekben Rydberg és Johanson (1978) vizsgálták először. A módszer fluoreszcens mérésen alapult, a lizált sejteket agaróz gélbe ágyazták enyhe lúgos körülmények között, lehetővé téve a DNS részleges letekeredését. A semlegesítés után a sejteket akridin narancs festéssel tették láthatóvá. A technika számos kritikus lépést tartalmazott, ezért nem terjedt el szélesebb körben (Rydberg & Johanson 1978).

1984-ben Östling és Johanson (1984) egy mikrogél elektroforézis technika kidolgozásával javította a DNS egyes sejtekben történő kimutatására alkalmas módszer érzékenységét. Ennek segítségével a DNS károsodás vizsgálata már sejtenként lehetségessé vált. Az ionizáló sugárzással kezelt sejteket folyékony állapotú agaróz gélbe keverték, majd tárgylemezre vitték fel vékony rétegben. A beágyazott sejteket lizálták, a gélben visszamaradó magot elektroforetizálták, majd a követéshez akridin narancs festéket alkalmaztak, végül az értékelést fluoreszcens mikroszkóppal végezték. Östling és munkatársai (1984) azt találták, hogy a magtól eltávolodó DNS darabkák mennyisége arányos volt a sejteket érő ionizáló sugárzás dózisával. Az elektroforézis és a lízis semleges körülmények között zajlott. A Comet assay fontos jellemzője, hogy kisszámú sejt szükséges hozzá és nem kell radioaktív jelölést használni (Östling & Johanson 1984).

Singh és munkatársai (1988) változtattak a módszeren, alkalikus körülmények között végezték a vizsgálatot, amely kellően érzékennyé tette a Comet assay-t genotoxicitási vizsgálatok elvégzéséhez is. A sejteket tárgylemezre öntött agaróz gélbe ágyazták, majd detergenssek és sóoldat segítségével lizálták, majd az alkalikus pufferben elektroforézist hajtottak végre. A DNS mivel negatív töltésű, a pozitív pólus irányába vándorolt. A DNS festésére etídium-bromidot használtak, míg az értékelést fluoreszcens mikroszkóppal végezték. A képződött csóva nagysága arányos a DNS károsodásának mértékével (2. ábra). A semleges közeg csak a kétszálú DNS törések kimutatását teszi lehetővé, az egy szálát érintő károsodások kimutatását nem. Mivel egyszálú törések gyakrabban keletkeznek, mint kettős szálú törések, a semleges feltételek nyilvánvalóan nem olyan érzékenyek a DNS károsodás kimutatására, mint a lúgos közeg. A lúgos körülmények hatására a sejtben található RNS is lebomlik, így nem zavarja a kimutatást. Singh és munkatársai (1988) módosították a mikrogél elektroforézis technikát, hogy lehetővé tegyék a DNS denaturációjának és egyszálú DNS migrációjának az értékelését, így lehetővé vált az egyszálú DNS törések értékelése is (Singh et al. 1988).



2. ábra: Egy károsodott sejt felépítése a Comet assay-ben (httpB)

Az 1990-es években Olive és munkatársai (1990) úgy fejlesztették tovább a technikát, hogy már a DNS károsodás mértékének sejtciklus függését is mérni lehetett (Olive et al. 1990). A Comet assay tulajdonképpen olyan más módszerek adaptációja, mint a nukleoid szedimentáció és a halo assay, de a lúgos körülmények bevezetése tette lehetővé az egyszálú törések vizsgálatát (McKelvey-Martin et al. 1993).

1.7.3. A Comet assay alkalmazása

A különböző emlős sejtekben többféle hatásra bekövetkezett DNS károsodás és javítás vizsgálatára *in vitro* és *in vivo* módszereknél is használtak már a Comet assay vizsgálatot. Előnyeinek köszönhetően a Comet assay széles körben alkalmazható módszerré vált a DNS károsodások vizsgálatában, biomonitringban, genetikai toxikológiában és besugárzott élelmiszerek elemzésében. Az üstökös vizsgálat (Comet assay) rendkívül hasznos a DNS excíziós repair biokémiai elemzésében is (McKelvey-Martin et al. 1993).

Green és munkatársai (1992) kimutatták, hogy a nem stimulált limfociták sokkal kifejezőbb csóvát mutatnak UV-C sugárzás után, mint a nagyobb a dNTP készlettel rendelkező stimulált limfociták. Dezoxiribonukleozidok hozzáadása csökkentette a DNS törések számát a nem stimulált UV fénnyel besugárzott limfocitákban, amit Comet assay-vel mértek (Green et al. 1992).

Az SCGE módszert sikerrel alkalmazták az oxidatív károsodásra való hajlam szűrésében is humán populációkból származó limfocita mintákban. Mivel az SCGE módszer viszonylag egyszerű, olcsó és gyors módszer, gyakorlatilag bármilyen típusú sejtnél alkalmazható *in vitro* vagy *in vivo* körülmények között, így kiválóan alkalmas a biomonitring vizsgálatokhoz. Az SCGE vizsgálattal történő monitorozás nem kizárólag emberi sejtek kutatásában használható, segítségével meghatározható pl. környezetszennyezés okozta DNS károsodás is különböző sejtvonalakban (pl. halból származó sejtekben) (McKelvey-Martin et al. 1993).

Az SCGE vizsgálat hatékony, érzékeny rendszer az indukált genotoxikus károsodások értékelésére is, továbbá az ismeretlen genotoxicitású vegyszerek vizsgálatához is alkalmazható. A módszer előnyei: (1) Lehetőséget nyújt DNS törések vizsgálatára a kísérleti állatok gyakorlatilag bármilyen szövetén, sőt humán biopsziás mintákban is, mivel a

módszerhez viszonylag kis sejtszám szükséges ($<2 \times 10^5$). Összehasonlításképpen a standard alkalikus elúciós vizsgálatához $2-5 \times 10^6$ sejt/szűrő szükséges. (2) A vizsgálat néhány órán belül elvégezhető, és képelemző szoftverrel az eredmények azonnal értékelhetők. Ezzel szemben az alkalikus elúciós vizsgálat legalább 24 órát vesz igénybe, továbbá még automatikus DNS meghatározással is további 8-24 óra szükséges az eredményekhez való hozzáféréshez. (3) Az eszközigénye nem nagyobb, mint más genetikai toxikológiában alkalmazott rövid távú vizsgálatoké. (4) Az eddigi eredmények azt mutatják, hogy az SCGE módszer hasonló érzékenységet mutat az alkalikus elúciós vizsgálattal (McKelvey-Martin et al. 1993). Az alkalikus elúciós vizsgálatnál lassan eluáljuk a DNS mintákat egy membránszűrőn keresztül. Lúgos körülmények között a kettős hélix egyszálúvá tekeredik le, amely képes a szűrő pórusain áthatolni. Ez egy nagyon érzékeny módszer a különböző vegyszerek által kiváltott DNS elváltozások kimutatására (Doerjer et al. 1988). Ahhoz, hogy az SCGE módszer a genotoxicitás vizsgálatokban használható legyen a vizsgálandó vegyület értékeléséhez az alábbi tesztprocedúra javasolt: 4 dózis, oldószeres és/vagy negatív kontroll és pozitív kontroll vizsgálata. A kísérletet javasolt két független ismételtsben elvégezni (McKelvey-Martin et al. 1993).

1.7.4. A módszer korlátai

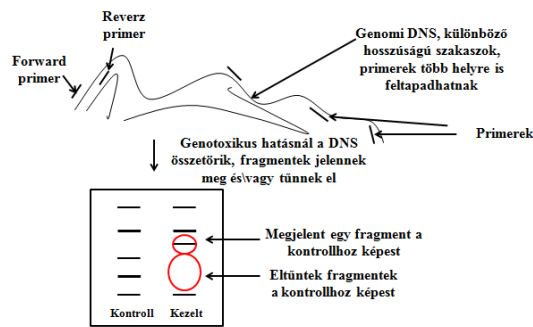
Előfordul, hogy a minták elemzésének gyakorlati korlátai vannak. Egy minta kiértékeléséhez például általában 50 üstökös (comet) kiértékelése ajánlott, azonban ha a populáción belül jelentős heterogenitás van a DNS károsodásban, nagyobb mintaszám szükséges. Egy másik korlátozó tényező lehet, hogy a vizsgálatához élő, egysejtes szuszpenzióra van szükség. Ha a minták főként elhalt vagy apoptotikus sejteket tartalmaznak, akkor a jellegzetes elváltozások pl. száltörések vagy báziskárosodások pontos kimutatása nem lehetséges. A szövetfeltérési módszereket fejleszteni kellene, hogy minimalizálják az eljárás okozta DNS károsodást. A mechanikai disszociációs módszerek (aprítás és szűrés) időigényességük miatt nem tekinthetők hatékony feltérési módszereknek. Az így feltárt sejtekből származó Comet assay nem ad felvilágosítást a DNS fragment méretéről, mivel a fragmentek nem különülnek el a rövid elektroforézis periódus alatt. Ehelyett, ahogy a DNS törések száma növekszik, a duplaszálú DNS letekeredik, ezért a DNS nagyobb frakciója távolodik el az üstökös fejétől. Néhány információ nyerhető a DNS károsodás eloszlásának méréséből is az üstökös farkán belül, de a pontos fragmentméretek csak olyan speciális technika segítségével végezhető, mint a pulzáló erőterű gélelektroforézis (Olive & Banáth 2006).

Az eredmények értelmezését tovább bonyolítja az a tény, hogy bizonyos kémiai anyagok által okozott DNS károsodások mennyisége és a károsodás biológiai hatása között nincsen egyértelmű összefüggés. Adott biológiai hatású gyógyszerek különbözhetnek a DNS törések számának tekintetében. Azok a kémiai anyagok, amelyek a szálak között keresztkötéseket hoznak létre blokkolják az egyszálú törések kimutatását. Emiatt a gyógyszerkeverékek hatásainak elemzése problémás lehet. Fontos figyelembe venni, hogy Comet assay-vel a DNS károsodás mértéke nem feltétlenül direkt genotoxicitás eredménye, mitokondriális vagy membránkárosodás is okozhat kiterjedt DNS fragmentáción keresztül apoptózist vagy nekrozist. Emellett bizonyos típusú DNS károsodások nagyon gyorsan kijavíthatóak, ami szintén megnehezíti az eredmények értékelését (Olive & Banáth 2006).

1.8. A RAPD PCR módszer

1.8.1. A RAPD módszer bemutatása

1990-ben Williams és munkatársai (1990) egy új, speciális PCR technikát írtak le, amelyet RAPD-nak (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (3. ábra) neveztek el (Williams et al. 1990). A módszer lényege, hogy primerként egy- vagy kétféle, rövid (10 bázispár hosszúságú), random nukleotid sorrendű oligonukleotidokat használnak. A random bázissorrend miatt a primerek bármely genomi DNS-en, több szakaszhoz is képesek hibridizálni, ezért a reakció tervezése során nincs szükség a genomi DNS szekvencia ismeretére (http27; Bardacki 2001). A primerek kötődése attól függ, hogy mennyi és milyen mértékben komplementer régiók találhatók a DNS templáton (http27). A reakció eredményeként egy specifikus fragment helyett több, különböző méretű fragment keletkezik. Az amplifikált termékek elválasztása agaróz gélben gélelektroforézissel történik, a szakaszokat leggyakrabban etídium-bromiddal teszik láthatóvá. A gélelektroforézist követően kialakult fragmentmintázat jellemző az egyedre, amelyből a DNS származik, ezért számos vizsgálatban molekuláris markerként használható (Bardacki 2001). A reakció során nem keletkezik fragment például akkor, ha a feltapadt primerek túl messze vannak (több ezer bázis) egymástól vagy a primerek 3' végei nem állnak szemben egymással. Ezért, ha mutáció történik a DNS templát azon részén, amely korábban komplementer volt a primerrel, akkor nem keletkezik PCR termék, egy eltérő amplifikált DNS szakasz mintázatot eredményezve a gélen (http27).



3. ábra: RAPD sematikus ábrája

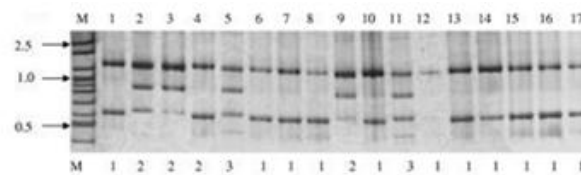
1.8.2. A RAPD alkalmazása

Mivel a RAPD technika egyszerű és olcsó, széles körben alkalmazható a biológia számos területén, így például a genetikai térképezésben is. A RAPD analízis gyorsasága és hatékonysága arra ösztönözte a kutatókat, hogy nagy denzitású genetikai térképezést végezzenek számos növényfajon, mint például lucernán, babon, almán viszonylag rövid idő alatt. Postlethwait és munkatársai (1994) 401 polimorf genetikai markert térképeztek fel zebradánióban. RAPD markereket használtak más halfajok genetikai térképének elkészítésére, mint például a szivárványos pisztráng. Az egyik hátránya ezen markerek használatának az, hogy dominánsak. Az egyik legszélesebb körű alkalmazása a RAPD technikának, olyan markerek azonosítása, amelyek szükségesek a teljes genom feltérképezéséhez (Bardacki 2001).

A DNS alapú megközelítések alkalmazása a populáció genetikai vizsgálatokban korlátozott, túl sok egyéni mintára lenne szükség minden egyes populációból, hogy pontos becslést adjon az allélokról és a genotípus gyakoriságokról. A viszonylag magas költségek, a kifinomult eszközök, a jól képzett személyzet igénye, illetve a lassúság további korlátozó tényezők a populáció genetikai vizsgálatokban. A RAPD technika egyszerűsége és gyorsasága miatt nagy figyelmet kapott a DNS szintű genetikai eltérések feltárásában. A RAPD analízis pontosabb becslést ad a közeli rokon populációk között és kevésbé pontos becslést ad a távoli rokon populációk esetében. A RAPD markerek jól alkalmazhatóak a filogenetikai kapcsolatok feltárásában, genetikai variabilitás kimutatására, például szúnyog fajok vagy parazita egysejtűek esetében is, néhány halfaj genetikai variációjának vizsgálatában, diagnosztikai célokra, a géntérképezésben, populációgenetikában, molekuláris evolúció genetikában és a növény-és állattenyésztésben is (Bardacki 2001). Hatékony módszer lehet a genotoxikus hatások észlelésében is (1.8.4. fejezet) (Atienzar & Jha 2006).

A RAPD hatékony módszer lehet baktériumfajok szerológiai típusainak elkülönítése során is. A reakciók tervezésekor fontos a megfelelő random primerek kiválasztása. A

különböző szakaszok eltérő mintázatokat eredményeznek, amelyek lehetővé tehetik az egyes törzsek még specifikusabb felismerését (4. ábra) (<http27>).



4. ábra: Ezüsttel festett poliakrilamid gélen 3 különböző, az OPE15 primer által létrehozott RAPD profil (<http27>)

1.8.3. A RAPD előnyei és korlátai

A RAPD vizsgálat és a hozzá kapcsolódó technológiák számos előnnyel rendelkeznek. Ezek a technológiák viszonylag olcsók és nem igényelnek speciális és drága eszközöket vagy a kiindulási DNS szekvencia ismeretét. A RAPD módszerrel a DNS károsodások széles skáláját is lehet detektálni (például DNS adduktok, DNS törések), valamint a mutációkat is (pontmutációk és nagy átrendeződések). A rákkutatás területén a RAPD módszer és a kapcsolódó technikák lehetővé teszik az egyidejű detektálást és a genomikai változások klónozását, a megváltozott régió előzetes ismerete nélkül. A módszer korlátai a hamis amplifikációs termékek megjelenése a DNS templátot nem tartalmazó negatív kontroll reakciókban, valamint a reprodukálhatóság (Atienzar & Jha 2006). Tény, hogy a hagyományos PCR is érzékeny a reakció körülmények változására, de a RAPD módszer még inkább. Problémát okozhat a sávok eltérő intenzitása is. A magasabb vagy alacsonyabb intenzitású sávok megjelenésének oka még nem ismert. Talán néhány primer nem teljesen illik össze az adott szekvenciával, az amplifikáció néhány ciklusban nem történik meg, így a sávok halványabbak lesznek. A legfontosabb tényezőnek a RAPD profil reprodukálhatósági problémájának szempontjából a nem megfelelően előkészített DNS templátot találták (Bardacki 2001).

Eltérő koncentrációjú DNS templátok bizonyos sávok elvesztését vagy megjelenését eredményezhetik. Különös gondot kell fordítani arra, hogy a más forrásokból származó DNS-t (pl. fertőzésekből és parazitáktól származó szennyező DNS az anyagban, amelyből a DNS-t izoláljuk) távol tartsuk az amplifikálandó DNS-től (Bardacki 2001).

A RAPD módszer inkább kvalitatív vagy szemikvantitatív adatokat generál, mint kvantitatív adatokat, ezért az eredmények nem vagy csak igen bonyolult módszerrel számszerűsíthetők (Atienzar & Jha 2006). A reprodukálhatósági probléma ellenére a RAPD módszer valószínűleg mindaddig fontos marad, amíg a többi DNS alapú technika alulmarad a költségek, az idő és munkaerő tekintetében (Bardacki 2001).

1.8.4. A RAPD, mint genotoxicitást vizsgáló módszer

Komoly aggodalomra ad okot a környezeti szennyeződések hatása a természetes populációk genetikai felépítésére. A genetikai hatások egyik osztálya magában foglalja a DNS szerkezeti változásait és funkcióit, beleértve a DNS adduktokat, DNS töréseket és a kémiai expozíció eredményeként (genotoxikus hatások) megjelenő mutációkat. Ugyanakkor indirekt genetikai hatások is felmerülhetnek a genotoxikus ágensek és a DNS kölcsönhatásának következményeként. A különböző típusú DNS károsodások és mutációk is megváltoztatják a RAPD profilt (például változás a sávok intenzitásában, sáv megjelenése, eltűnése) (Atienzar & Jha 2006).

Az első vizsgálatot, amelyben a genotoxikus hatások mérésére a RAPD módszert használták, Savva és munkatársai (1994) végezték. Benzo[a]pirénnek kitett patkányok RAPD profilját vizsgálva bizonyos sávok megjelenését vagy eltűnését tapasztalták a kontrollhoz képest. Krane és munkatársai (1999) felvetették, hogy a RAPD módszer alkalmas lehet a környezeti szennyezőanyagok ökoszisztémákra gyakorolt közvetlen hatásának értékelésére. A legtöbb tanulmány szerint, a különböző hatásoknak kitett populációk RAPD profiljának megváltozását leggyakrabban valóban DNS károsodás, mutációk, vagy populáció genetikai hatások eredményezték (Atienzar & Jha 2006).

A RAPD-PCR-t sikeresen alkalmazták *in vitro* genotoxicitási vizsgálatban is. Becerril és munkatársai (1999) egy jól ismert karcinogén, a mitomicin C hatását vizsgálták RTG-2 hal sejtvonalon RAPD módszerrel. A kapott sávok elemzése jól mutatta a különbséget a kontroll és a kezelt csoportok között (Mohanty et al. 2011).

A RAPD-ot sikeresen alkalmazták fémek (például mangán, kadmium, réz), 4-n-nonil-fenol és 17- β ösztadiol, UV-, gamma-sugárzás és röntgensugárzás, valamint radionuklidok indukálta DNS hatások kimutatására valamint kinetikai vizsgálatokban is. Egyes tanulmányok tovább elemezték a kezelt populációból kapott RAPD profilokban bekövetkezett változásokat. Például RAPD módszert használtak szennyezésnek kitett és referencia nyugati szúnyogirtó fogaspony (*Gambusia affinis*) populációk közötti markerek azonosítására (Atienzar & Jha 2006).

A genotoxicitás vizsgálatokban alkalmazható különböző típusú módszerekről, köztük a RAPD-ról kimutatták, hogy számos előnnyel (egyszerűség, gyorsaság, a kísérletek alacsony költsége és a rendellenes fragmentek hatékony kimutatása) rendelkeznek a genomi mutációk detektálásában (Mohanty et al. 2011).

2. A vizsgálatok módszerei

2.1. Zebradánió tartása

A vizsgálatokat a Halgazdálkodási Tanszék zebradánió laboratóriumában végeztük, vad típusú (AB) zebradánió vonalon. A halakat Techniplast ZebTEC (Techniplast S.p.a.) recirkulációs rendszerben tartottuk. Ez kifejezetten zebradániók tartására kialakított automatizált rendszer, mely biztosítja a víz szűrését, forgatását és a megfelelő környezeti feltételeket. A halakat állandó 27,5 °C-os vízben, 14 óra világos, 10 óra sötét fényciklusban tartottuk. A kifejlett egyedeket naponta kétszer etettük teljes értékű haltáppal (Special Diets Services-SDS), emellett heti két alkalommal frissen keltetett sórák (*Artemia nauplii*) kiegészítést kaptak. A kifejlett egyedeket a szaporítást megelőző nap délutánján ívató medencékbe (Techniplast S.p.a.) helyeztük. Az 1 literes edényekben a hím és nőstény zebradániók ívás előtti elkülönítését válaszfal biztosította. Ennek egy időben történő kivételével szinkronizáltuk az ívást. A lerakott ikrákat a rácsos aljzat óvta. Az ikrák összegyűjtése után mikroszkópos vizsgálattal kiválogattuk a termékenyült szemeket, melyeken elvégeztük a megfelelő kezeléseket. A kezelt ikrákat embriótoxicitás és Comet assay vizsgálathoz használtuk fel.

2.2. Embriótoxicitás vizsgálat (Fish Embryo Toxicity Test-FET) menete

A vizsgálatot az OECD 236 irányelv ([http15](http://15), OECD 236) előírásai szerint végeztük. Az embriókat a 4-etil-benzaldehiddel (Sigma-Aldrich, CAS: 4748-78-1) kezeltük, kontrollként a haltartó rendszer vizét használtuk.

A vizsgálat során a termékeny embriókat 24 lyukú szövettenyésztő plate-ekbe helyeztük (mélyedésenként 1 embrió + 2 ml kezelőoldat), egy órával a termékenyülés után (1 hpf = hours post fertilization). A plate-eket 27,5 °C-on inkubáltuk. Minden koncentráció esetén 4 csoportot alakítottunk ki, 12-12 embrióval. A beállított koncentrációk a következők voltak: kontroll I.; kontroll II.; 0,2; 0,5; 1; 5; 10; 12; 15; 17; 18; 19; 21; 23; 25; 27; 29; 30; 35; 40; 50; 55; 60 mg/l 4-EBA. A plate-eket parafilmmeel tekertük körbe, a kontrollok külön platekbe kerültek.

A teszt 120 órás időtartama alatt naponta feljegyeztük a mortalitást, valamint az esetlegesen kialakuló torzulásokat (farok torzulása, teljes testen megmutatkozó torzulások, perikardiális ödéma, sziködéma). A harmadik napon (72 hpf) sötét és világos háttérű felvételeket készítettünk (kontrollok, 0,5; 1; 5; 10; 12; 15; 18; 20; 30; 40 mg/l-es koncentrációkról) a torzulásokról, az embriókat 30-szoros nagyításban, míg a farokúszójukat 60-szoros nagyításban fotóztuk Leica M-205FA mikroszkóp alatt. A kapott pusztulási

eredmények alapján a 24. órától a 120. óráig minden napra kiszámoltuk az LC_{50} és LC_{10} értékeket. A vizsgálat 5. napján az LC_{10} értékek alapján kiválasztott koncentrációkból 96%-os etanolba tettük el az embriókat, majd $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk a mintákat a RAPD vizsgálatban történő felhasználásig.

2.2.1. Statisztikai értékelés

A teszt során LC_{50} és LC_{10} értékeket lineáris regresszió analízis segítségével határoztuk meg, a statisztikai elemzést és az adatok értékelését a GraphPad Prism 4.0 szoftver segítségével végeztük.

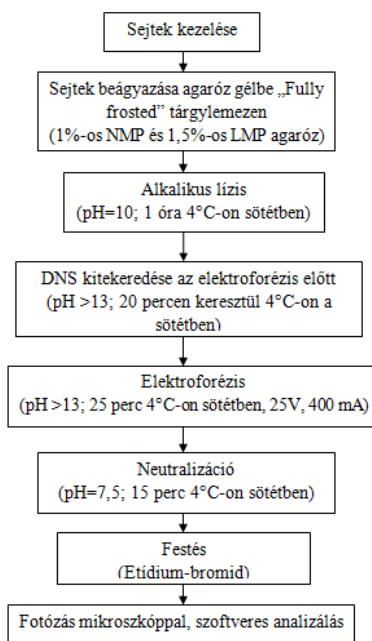
2.3. Comet assay vizsgálat menete

A Comet assay-hez (5. ábra) 1 napos (24 hpf) zebradánió embriókat használtunk. Az embriókat 4-etil-benzaldehiddel (0,5; 1; 5; 10; 12 mg/l) kezeltük, negatív kontrollként a zebradániós rendszer vizét, míg pozitív kontrollként Luperoxot (t-butil-hidroperoxid) (Sigma-Aldrich CAS:75-91-2) használtunk. A kezelést az embriótoxicitás teszthez hasonlóan egy órával a termékenyülés után (1 hpf) kezdtük el. A Luperox kezelést három koncentrációval végeztük: 84,6 mg/l (Kontroll⁺2); 325 mg/l (Kontroll⁺3) a vizsgálat előtt 2 órával, míg a 20 mg/l-es (Kontroll⁺20) koncentrációs kezelésre a 4-etil-benzaldehides kezeléssel egy időben került sor. Az ikrákat $27,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on inkubáltuk a kísérlet kezdetéig.

A Comet assay vizsgálat első lépésében előkészítettük a lemezeket. Az ún. „Fully frosted” (Menzel-Gläser) tárgylemezeket zsírtalanítás céljából egy éjszakán át metanolba (Reanal) áztattuk. A lemezeken két embriót lehet elhelyezni, ezért minden lemezre két 1%-os, normál olvadáspontú agaróz (Sigma-Aldrich) cseppet (80 μl) vittünk fel, úgy, hogy azok fedőlemezzel való borítás után sem érjenek össze. Ezután a lemezeket jégakkukra helyeztük, hogy az agaróz megszilárduljon. Ezt követően az ikrahéj eltávolítása érdekében az embriókat 2 mg/l koncentrációjú pronáz oldattal mostuk négy percen keresztül, majd háromszor átöblítettük desztillált vízzel.

A lemezekről eltávolítottuk a fedőlemezeket és minden mezőre 60 μl 1,5%-os alacsony olvadáspontú agarózt (Sigma-Aldrich) cseppentettünk, amelybe rögtön belehelyeztünk egy-egy embriót. A fedőlemezt erősen rászorítottuk a cseppek tetejére, így a pronázzal emésztett embriók sejtjei eloszlottak az agaróz gélben. A lemezeket visszahelyeztük a jégakkukra, hogy az újabb réteg agaróz is megszilárduljon. A fedőlemezek eltávolítása után újból 80 μl 1%-os, normál olvadáspontú agarózt cseppentettünk a mezőkre, újra lefedtük, majd lehűtöttük azokat. A fedőlemezek eltávolítása után a lemezek egy órát töltöttek sötétben (alufóliába csomagolva), $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os lízis oldatban, vertikális festőkádákba helyezve. Közben előkészítettük

az elektroforézishez szükséges felszerelést, valamint az elektroforézis oldatot. A lízishez szükséges idő letelte után a lemezeket kíméletesen leöblítettük desztillált vízzel, majd az elektroforézis kádba helyeztük azokat és annyi elektroforézis oldatot töltöttünk a kádba, hogy 2-3 milliméterrel ellepje a lemezeket. A 4 °C-os hűtőszekrényben 20 percig hagytuk így a lemezeket, hogy a DNS kitekeredése végbemehessen. A szükséges idő eltelte után bekapcsoltuk az elektroforézis készüléket (Bio-Rad PowerPac Basic) 25 V és 400 mA elektromos teljesítménnyel. Huszonöt perc után a gépet lekapcsoltuk és a lemezeket óvatosan kiemeltük a kádból, ügyelve arra, hogy a gélmezők ne csússzanak le. Ezután fénytől védve tizenöt percre 4 °C-ra, neutralizáló oldatba helyeztük azokat. Óvatos lecsepegtetés után nedves papírral kibélelt, fóliával borított üvegcádákba tettük a lemezeket és így tároltuk a fotózásig. Minden koncentrációból, beleértve a kontrollokat is, 40-40 embrió 96%-os etanolba tettünk el, majd a mintákat a RAPD vizsgálatban történő felhasználásig -20 °C-on tároltuk.



5. ábra: A Comet assay módszert összefoglaló folyamatábra (Žegura & Filipič 2004)

A Comet assay-hez szükséges oldatokat a következőképpen készítettük el:

- **Pronáz oldat:** a por állagú pronáz emzimből 2 mg/l koncentrációjú oldatot készítettünk, melyhez desztillált vizet használtunk oldószerként.
- **PBS** (phosphate buffered saline) oldat: a csomagoláson feltüntetett utasítást követve egy darab tablettát oldottunk fel 100 ml desztillált vízben.

- **Normál olvadáspontú agaróz (Normal melting point-NMP):** ebből 1%-os oldatot készítettünk, tehát 10 ml PBS oldathoz 0,1 g szemcsés agarózt adtunk, majd óvatosan melegítve homogén gél állítottunk elő.
- **Alacsony olvadáspontú agaróz (Low melting point-LMP):** 1,5%-os oldatot készítettünk, tehát 10 ml PBS oldatba 0,15 g szemcsés agarózt tettünk, majd óvatosan melegítve homogén gél állítottunk elő.
- **Lízis oldat:** 1000 ml lízisoldat elkészítéséhez 147 g NaCl-ot (nátrium-klorid), 37,2 g Na₂EDTA-t (dinátrium-etiléndiamintetraecetsav), valamint 1,21 g TRIS-t (Tris aminometán) használtunk. Az oldat pH-ját 10-re állítottuk be, majd közvetlenül a felhasználás előtt 10 ml Triton-X-100-at (t-oktilfenoxipoli-etoxietanol) adtunk hozzá.
- **Elektroforézis oldat:** 1000 ml oldat előállításához 0,37 g EDTA-t (etiléndiamintetraecetsav), valamint 180 ml 5 normális NaOH oldatot használtunk.
- **Neutralizáló oldat:** előállításához 48,456 g Tris-t használtunk, majd a pH-t 7,5-re állítottuk be.

Az oldatok pH-jának beállítását minden esetben HCl és NaOH oldatokkal végeztük. A művelethez Mettler-Toledo márkájú asztali pH-mérő készüléket használtunk. A DNS-károsodás láthatóvá tételéhez interkaláló festéket, etídium-bromidot használtunk. Minden mezőre 20 µl-t cseppentettünk, majd fedőlemezrel lefedtük. A fotózáshoz Nikon Eclipse E600 típusú mikroszkópot használtunk, fluoreszcens fénnel (510-560 nm), QImaging MicroPublisher 3.3 RTV kamerával és a hozzá tartozó QImaging szoftverrel.

2.3.1. Statisztikai értékelés

A statisztikai értékeléshez minden lemezről minimum 25 darab értékelhető cometet fotóztunk le. A DNS töredezettségét mutató adatok megállapításához szabadon felhasználható CometScore 15 szoftvert használtunk. Első lépésben a torzítások elkerülése végett a kiugró értékeket Grubb's teszt segítségével kizártuk a vizsgálatból. A normalitás vizsgálat alapján az adatok nem voltak normál eloszlásúak, ezért a százalékos adatokat először relatív százalékká alakítottuk, majd arkusz szinusz gyök transzformációt alkalmaztunk. Ezek után végeztük el az egytényezős varianciaanalízist (ANOVA). Post-hoc tesztként Tukey tesztet használtunk. A statisztikai értékelést GraphPad Prism 4.0 szoftverrel végeztük. Grafikonon ábrázoltuk az egyes kezelések átlagát, az azokhoz tartozó szórás értékeket, valamint a csoportok közötti különbségeket betűkkel jelöltük. A grafikont Microsoft Excel szoftver használatával készítettük el.

2.4. RAPD PCR vizsgálat menete

2.4.1. DNS tisztítás

Az embriótoxicitás teszt (2.2. fejezet) során 96%-os etanolban, -20 °C-on tartott 5 napos embriókból a DNS-t DNS-tisztító kit (E.Z.N.A Tissue DNA Kit D3396-02) segítségével vontuk ki, a gyártó előírása szerint.

A Comet assay vizsgálatban használt 1 napos embriók DNS-ét nátrium-hidroxid (NaOH) segítségével tártuk fel (Meeker et. al. 2007) az alábbi protokoll szerint: 1. A mintákról eltávolítottuk az etanolt, majd az embriókat steril PCR csövekbe helyeztük és 100 µl 50mM-os NaOH-ot mértünk a mintákhoz. 2. A mintákat 95 °C-on 10 percen keresztül melegítettük Esco Swift MaxPro típusú PCR készülékben. 3. A melegítést követően 4 °C-ra hűtöttük le a mintákat, majd a lúgos közeg semlegesítése érdekében hozzáadtunk 10 µl 1 M-os TRIS oldatot (pH=8,06). 4. A teljes mintákat steril eppendorf csövekbe pipettáztuk, majd 13500 rpm fordulatszámon 1 percen keresztül centrifugáltuk. 5. Végül a felülúszót steril eppendorf csövekbe pipettáztuk, majd meghatároztuk a DNS koncentrációját és tisztaságát.

2.4.2. DNS koncentráció és tisztaság meghatározása

A kitisztított DNS-ek koncentrációjának (ng/µl) és tisztaságának (260 és 280 nm-en mért abszorbancia hányadosa) meghatározását nano-fotométerrel (Implen) végeztük. Az 5 napos embriókból kinyert DNS minták esetében a mérésnél a vak minta a tisztításkor használt eluáló puffer volt, míg az 1 napos embriókból kinyert DNS mintáknál a vak mintát 10 µl TRIS és 100 µl NaOH oldat keveréke alkotta.

2.4.3. RAPD PCR reakció

A koncentráció és tisztaság meghatározását követően a DNS minták koncentrációját nukleázmentes vízzel 50 ng/l-re állítottuk be, majd összeállítottuk a RAPD PCR reakciókat: 10x DreamTaq puffer (Fermentas, 20mM MgCl₂ tartalommal), 0,05 mM MgCl₂, 0,25 mM dNTP, 0,006 pM RAPD primer, 0,04 U DreamTaq polimeráz (Thermo Scientific), 100 ng DNS, 20 µl végtérfogatban.

A RAPD vizsgálatok során az 1 napos embriókon 8 (UBC 102, 103, 105, 115, 120, 121, 122, 126), az 5 naposokon 28 primert (UBC 102, 103, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 124A, 124B, 125, 126, 127, 128, 129, 130) teszteltünk.

A RAPD PCR reakciót a ThermoHybaid PX2 PCR géppel végeztük el az alábbi program szerint: 94 °C (2 perc); 45x 94 °C (20 másodperc), 40 °C (30 másodperc), 72 °C (1,5 perc); 72 °C (5 perc).

2.4.4. Agaróz gélelektroforézis

A PCR reakciók eredményét 1,5%-os agaróz gélben ellenőriztük, a fragmentumokat elektroforézis kádban elektromos feszültség hatására választottuk szét. Molekulasúly markerként GeneRuler Ladder Mix-et (Fermentas) használtunk.

A mintákat UV-fényben, etídium bromid segítségével tettük láthatóvá. A gélképeket a Syngene InGenius készülék és a GeneSnap program segítségével rögzítettük.

2.4.5. Adatok értékelése, statisztika

A gélképek értékelését a GelAnalyzer 2010a ingyenesen elérhető szoftverrel végeztük. Meghatároztuk a kezelések hatására megjelenő és eltűnő fragmentek számát a kontrollhoz képest, majd az eltéréseket átlagoltuk és kiszámoltuk a minták ún. genomikus stabilitását (Mohanty et al. 2011):

$$G. S. = 100 - (100 \cdot a/n),$$

ahol „a” az eltérést mutató fragmentek száma, „n” a negatív kontroll RAPD mintázatában megjelenő fragmentek száma. Az eredményeket GraphPad Prism 4.0 szoftver segítségével értékeltük ki. Az értékeket egyszempontos ANOVA módszerrel vetettük össze, post-hoc tesztként Dunnett tesztet használtunk ($p < 0,05$).

3. Eredmények

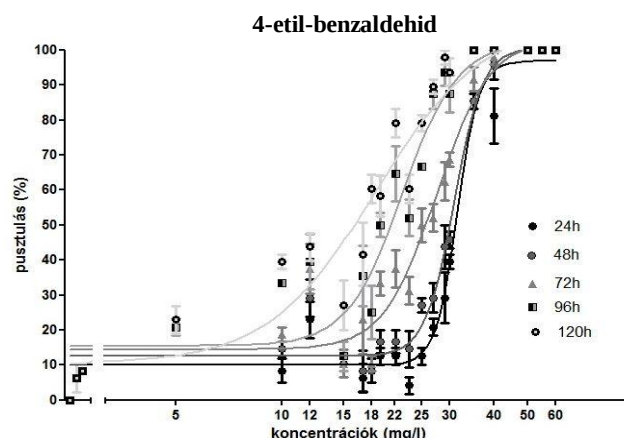
A kísérletek során első lépésben meghatároztuk a 4-etil-benzaldehid embriótoxikus hatásait, majd a szubletális koncentrációkkal kezelt embriókban vizsgáltuk a 4-etil-benzaldehid DNS-károsító hatását is. Az általánosan elfogadott és széleskörűen alkalmazott genotoxicitás teszt, a Comet assay mellett egy, az irodalmi adatok alapján ígéretesnek tűnő módszerrel, a RAPD-al is elvégeztük a vizsgálatokat.

3.1. Embriótoxicitás (FET) teszt eredményei

A FET teszt során az embriókat a 4-EBA 21 különböző koncentrációjával (lásd 2.2. fejezet) kezeltük, negatív kontrollként a zebradániós haltartó rendszer vizét használtuk. Az OECD 236 irányelv ([http15](http://15), OECD 236) által javasolt 96 órás időtartamot 120 órára növeltük, egyrészt hogy pontosabb képet kapjunk az elváltozásokról, másrészt azért, hogy megfelelő mintákat kapjunk a RAPD vizsgálathoz szükséges DNS-tisztításhoz. A vizsgálat során az anyag illékonyasága miatt a kontrollokat külön plate-ekbe tettük, továbbá parafilmmel is körbetekertünk minden egyes plate-et.

A 120 órás vizsgálat során a 3. napon került sor az embriók fotózására sötét és világos háttérrel. A világos háttérű fotókon a pigmentáltságbeli eltérések figyelhetők meg, míg a sötét háttérű fotókon a farokúszó körvonala és elváltozásai, illetve a szelvényezettség és az embrió

szervei látszódnak jobban. A teszt alatt naponta feljegyeztük a mortalitást és a szubletális hatásokat (például ödéma). A mortalitás és az egyes koncentrációk közötti dózis-hatás összefüggést grafikonon (6. ábra) ábrázoltuk.

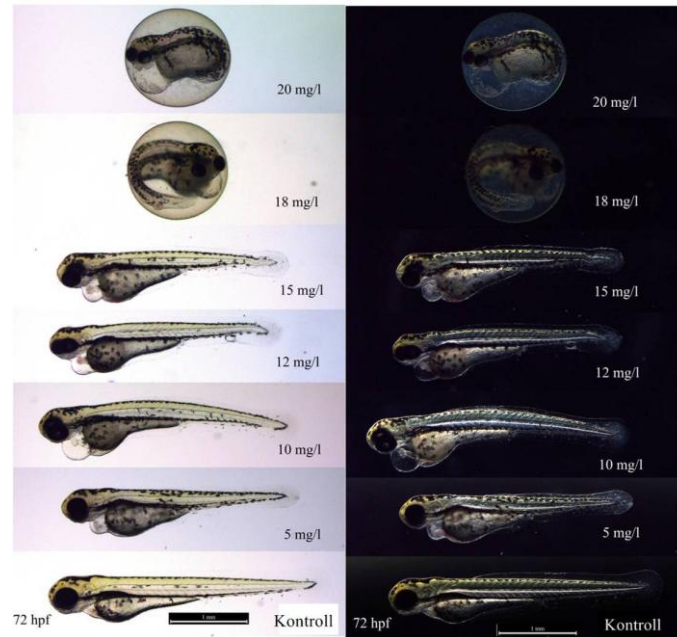


6. ábra: A 4-etil-benzaldehiddel végzett embriótesztben kapott dózis-hatás görbék

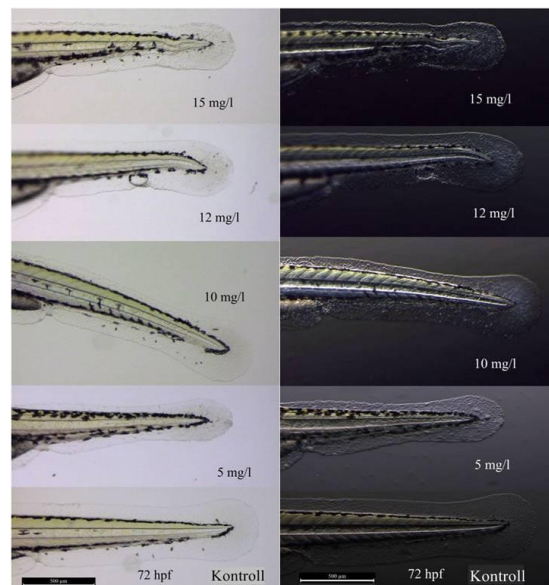
A grafikonon látható, hogy a kezelés előrehaladtával az LC értékek egyre alacsonyabbak lettek, ami általában jellemző a toxikológiai tesztekénél. Minél hosszabb ideig tesszük ki a modellt az anyagnak, annál érzékenyebb lesz rá.

Az embrióteszt során lineáris regresszió analízissel megállapított LC₅₀ és LC₁₀ értékek (lásd 8. fejezet Függelék, 1. táblázat) a következőképpen alakultak: a 24., 42., 72., 96. és 120. órában az LC₅₀ értékek 31,45 mg/l, 30,85 mg/l, 27,52 mg/l, 22,01 mg/l valamint 18,44 mg/l; az LC₁₀ értékek pedig 26,91 mg/l, 25,06 mg/l, 18,81 mg/l, 14,82 mg/l és 8,49 mg/l voltak.

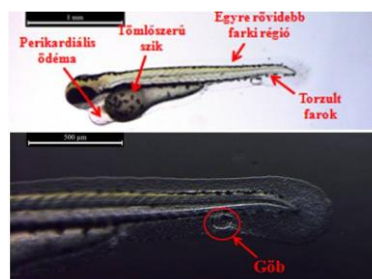
Az embriótoxicitás vizsgálat során kíváncsiak voltunk arra, hogy az általános toxicitási tünetek mellett (ödéma, pigmentáltságbeli eltérések) megjelennek-e olyan hatások, amelyek az anyagra jellemző specifikus hatások lehetnek. A normál (kontroll) embriók (7. ábra; 8. ábra) jellemzője, hogy 3 naposan pigmentálódnak, arányos a testfelépítésük, nincs perikardiális ödéma, a szik kezd felszívódni és megnyúlt körte alakja van, a farok szabályos, jól elkülöníthető az izomszövet és az úszószegély (7. ábra). Egyértelmű szubletális hatások az 5 mg/l-es koncentrációtól voltak megfigyelhetők, (7. ábra; 8. ábra) továbbá specifikus hatást is észleltünk, a farki régió ettől a koncentrációtól kezdve egyre inkább lerövidült. A koncentráció további növekedésével a szik alakja egyre inkább tömlőszerűvé, a perikardiális ödéma egyre nagyobbá, az úszószegély egyre szabálytalanabbá vált, a farok alakja torzult, a test megrövidült. Már 15 mg/l-től előfordult olyan embrió, ami már ki sem kelt, de a magasabb koncentrációkban ez még inkább megfigyelhető volt. 12 mg/l-es koncentrációnál (9. ábra) a nem specifikus hatások mellett újabb specifikus hatás megjelenését is tapasztaltuk, göb alakult ki a farok ventrális részén.



7. ábra: 72 órás (72 hpf) zebradánió embriók a 4-EBA különböző koncentrációiban és a kontrollban (méretskála: 1 mm)



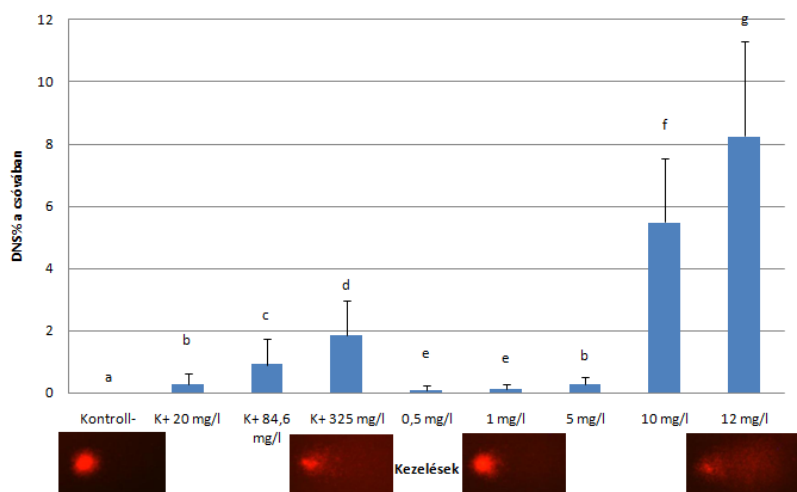
8. ábra: 72 órás (72 hpf) zebradánió embriók farokúszói a 4-EBA különböző koncentrációiban és a kontrollban (méretskála: 500 µm)



9. ábra: 72 órás (72 hpf) zebradánió embrión megfigyelhető nem specifikus (perikardialis ödéma, tömlőszerű szik és specifikus hatások (torzult farok, göb, megrövidült farki régió) 4- EBA 12 mg/l-es koncentrációjában

3.2. Comet assay vizsgálat eredményei

A Comet assay-t 1 napos zebradánió embriókkal végeztük el. Az embriókat 4-etil-benzaldehiddel (0,5; 1; 5; 10; 12 mg/l-es koncentrációkban) kezeltük, negatív kontrollként a zebradániós haltartó rendszer vizét, pozitív kontrollként három különböző koncentrációjú Luperox oldatot használtunk. A csóva DNS %-nak változásait grafikonon ábrázoltuk (11. ábra).

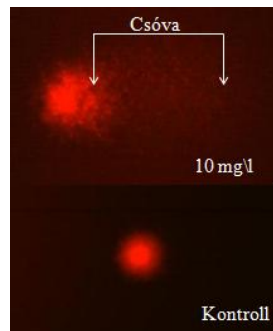


11. ábra: 4-etil-benzaldehid kezelés hatására bekövetkezett változás a csóva DNS%-ban. Az egyes betűk a csoportok közötti különbségeket jelölik, a szignifikánsan különböző csoportok különböző betűjelet kaptak, míg a szignifikánsan nem különböző csoportok egyforma betűjelet kaptak. Kontroll-: negatív kontroll; 4-EBA kezelés: 0,5; 1; 5; 10; 12 mg/l koncentrációban; Luperox kezelés: K+: pozitív kontroll (84,6 mg/l); (325 mg/l); (20 mg/l).

A grafikon alatti képeken az adott koncentrációval kezelt embriók Comet assay képei láthatók.

Az egytényezős varianciaanalízis eredményeként megállapítottuk, hogy a negatív kontrolltól mind a pozitív kontroll, mind pedig a 4-EBA-val kezelt csoportok szignifikánsan különböztek, a 0,5 mg/l-es és az 1 mg/l-es koncentrációval kezelt csoportok között pedig nem volt szignifikáns különbség. A pozitív kontrollok mind egymástól mind a többi koncentrációtól szignifikánsan különböztek. Az 5 mg/l-es, 10 mg/l-es, 12 mg/l-es koncentrációk egymástól és a többi kezelt csoporttól is szignifikánsan különböztek. Megállapíthatjuk, hogy a 4-EBA koncentrációjának növekedésével szignifikánsan megnőtt a DNS károsodás mértéke, egyre nagyobb %-ban jelent meg a DNS a csóvában, ami növekvő mértékű DNS károsodásra utal.

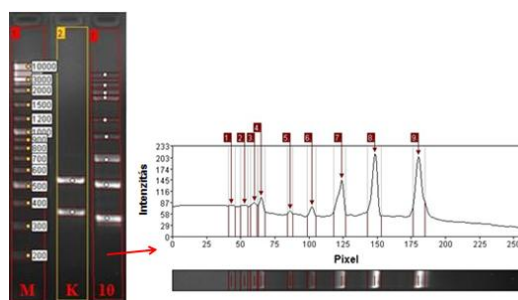
A különbség a negatív kontrollhoz képest sok esetben már szoftveres kiértékelés nélkül is látható volt a mikroszkóppal készült felvételeken (10. ábra). A 4-EBA-ról ezek alapján elmondhatjuk, hogy a vizsgált koncentrációkban genotoxikus hatása volt.



10. ábra: 1 napos zebradánió embrió Comet assay képe a kontrollban és a 4-EBA 10 mg/l-es koncentrációjában

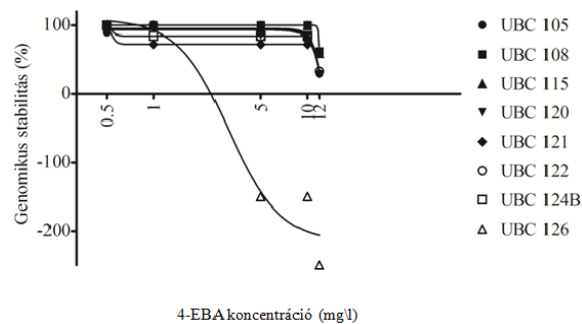
3.3. RAPD vizsgálat eredményei

A RAPD vizsgálatokhoz a Comet assay-ből származó 1 napos embriókat és az embriótoxicitás tesztből származó 5 napos embriókat használtuk. Az 1 napos embriók esetében, mivel azok még kevés sejtet tartalmaznak, meglehetősen nehéz megfelelő mennyiségű DNS-t nyerni kitisztítása, viszont a Comet assay későbbi fejlődési stádiumokban már nem végezhető el. Az 5 napos embriókból már biztosan jó minőségű és mennyiségű DNS nyerhető, ezért először 5 napos embriókat vizsgáltunk, 28 különböző RAPD primerrel (UBC 102, 103, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 124A, 124B, 125, 126, 127, 128, 129, 130). Az eredmények alapján (lásd 8. fejezet Függelék, 2. táblázat) a 28-ból 20 primer eredményezett eltérő RAPD mintázatot a kezelt embriókban (12. ábra). Ezek közül csak az egyértelmű tendenciát mutató (vagy fragmentszám csökkenés vagy növekedés) primerek eredményeit használtuk fel a genomi DNS stabilitás változásának meghatározásához. A kiértékelés során a fragment méreteket is meghatároztuk a RAPD mintázatban.



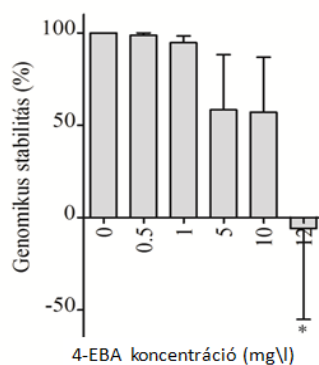
12. ábra: 5 napos zebradánió embrió RAPD profilja UBC 126 primerrel a GelAnalyzer 2010a szoftverrel elemezve. A 10 mg/l-es koncentráció fragmentmintázatának intenzitását mutatja a grafikon. (M: marker, K: kontroll, 4-EBA kezelés: 10 mg/l)

Az UBC 126 jelzésű primer esetében a kezeletlen embriókban csak 2 fragment keletkezett, majd a fragmentek száma a koncentráció növekedésével fokozatosan emelkedett, ami negatív genomi stabilitás értékeket eredményezett. A többi primer esetében nem volt ilyen drasztikus a változás, ezeknél pozitív értékeket kaptunk (13. ábra).



13. ábra: Az egyes primerek genomikus stabilitása %-ban meghatározva

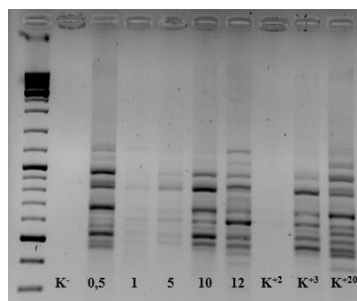
Az adatokat átlagoltuk és oszlopdiagramban is ábrázoltuk (14. ábra).



14. ábra: Az egyes kezelések genomikus stabilitásának (%) átlaga

Szignifikáns különbséget a kezeletlen kontrollhoz képest csak a 12 mg/l-es kezelés hatására észleltünk, abban az esetben, ha összesítettük mind a 28 primerrel kapott eredményeket. A primereket külön értékelve viszont előfordult, hogy már a legalacsonyabb koncentráció (0,5 mg/l) is megváltoztatta a RAPD mintázatot.

Az egy napos embriókból származó DNS-mintákon már csak 8 primert (UBC 102, 103, 105, 115, 120, 121, 122, 126) teszteltünk. Jól összehasonlítható fragmentmintázatot (15. ábra) azonban nem kaptunk.



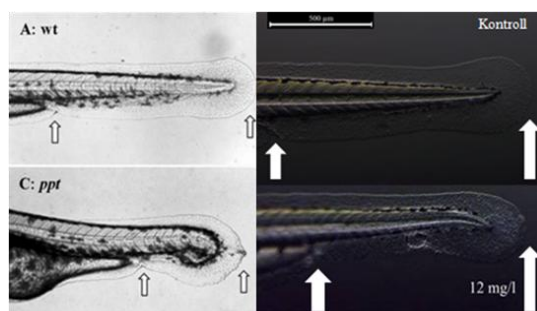
15. ábra: 1 napos zebradánió embrió RAPD profilja UBC 102-es primerrel

(K⁻: negatív kontroll; 4-EBA kezelés: 0,5; 1; 5; 10; 12 mg/l koncentrációban; Luperox kezelés: K⁺² (84,6 mg/l); K⁺³ (325 mg/l); K⁺²⁰ (20 mg/l))

4. Értékelés és következtetések

Kísérleteink során a 4-EBA ivóvízben megtalálható mennyiségéhez képest (pg/l vagy az alatti) jóval nagyobb koncentrációkkal (mg/l) dolgoztunk. Azonban a vízfertőtlenítési melléktermékekkel, így a 4-EBA-val is, az emberi szervezet napi szinten és hosszú távon kerül kapcsolatba például az ivóvíz fogyasztás vagy zuhanyzás révén, így számolni kell azzal a lehetőséggel, hogy ezek az anyagok akkumulálódhatnak a szövetekben (Rácz et. al 2012).

A 4-EBA zebradánio embriókra gyakorolt hatásainak felderítéséhez embriótoxicitás tesztet alkalmaztunk. Az embriótoxicitás tesztben kapott eredményeink specifikus hatások megjelenését mutatták a zebradánio embriókon, melyekről a szakirodalomban is találtunk eredményeket. A farki régió ilyen típusú torzulását, mint fenotípust az ún. *ppt* (pipetail) mutáns (16. ábra) embriókban írták le (Westfall et al. 2003).



16. ábra: Egy ppt mutáns embrió (Westfall et al. 2003), valamint az általunk végzett embriótesztből származó, 12 mg/l -es 4-EBA koncentrációval kezelt embrió farki régiójának összehasonlítása. (A: vad típus-wild type, C: ppt mutáns embrió. A nyilak a sziktömlőtől a fark végéig mutatnak.)

A ppt mutánsokban a fenotípust a *wnt5* gén mutációja okozza. A *wnt5* a *wnt* géncsalád tagja, melyek olyan szignalizációs fehérjéket kódolnak, amelyek fontos szerepet töltenek be az onkogenezisben és számos fejlődési folyamatban, például meghatározzák a sejtek sorsát, vándorlását, polaritását az embriógenesis során, valamint meghatározzák a szervek és az idegrendszer, fejlődését. A *wnt-5* útvonal sérülése főként az endodermális sejtek differenciálódására pl. érfejlődésre (angiogenezis) hat (van Amerongen & Nusse 2009). Zebradániónál bizonyos kis molekulájú anyagok szintén képesek a *ppt* fenotípust előidézni (Westfall et al. 2003). Korábbi vizsgálatok emellett kimutatták, hogy a 4-es C-atomon oldalláncot hordozó benzaldehidek (amilyen a 4-etil-benzaldehid is) gátolják a simaizomsejtek Ca^{2+} csatornáit (Anana et al. 1997). Eredményeink és a szakirodalmi adatok alapján úgy véljük, hogy a 4-EBA gátolja a *wnt5* útvonalat, valamint gátolja Ca^{2+} csatorna működését az erek falának simaizom szövetében.

A genotoxicitás vizsgálatokat két eltérő módszerrel is elvégeztük. Kíváncsiak voltunk arra, hogy a népszerű Comet assay vizsgálatok érzékenysége összevethető-e egy kevésbé

elterjedten használt PCR alapú módszerrel, a RAPD technikával. Megállapítottuk, hogy mindkét technika képes volt kimutatni a 4-EBA genotoxikus hatását zebradánió embriókban. A Comet assay azonban jóval érzékenyebbnek bizonyult, már a legkisebb vizsgált koncentráció (0,5 mg/l) esetében is szignifikáns eltérést mutatott a kontrollhoz képest, 1 napos mintákban. A RAPD eredményei ezzel szemben még 5 napos korban is csak magasabb koncentrációkban utaltak genotoxikus hatásra a legtöbb primer esetében.

A RAPD, bár egyszerűbb módszernek tűnhet (1 nap alatt kivitelezhető), mégis összetettebb, nehezebb módszer, mint a Comet assay. A RAPD esetében bizonyos primerek nem adnak fragmentet, vagy azonos fragmentmintázatot adnak, mint a kontroll minta, attól függően, hogy a törések hol következtek be a DNS-en. A kiértékeléshez fontos, hogy a reakciók során azonos mennyiségű templátokból induljunk ki. A kísérletek során megállapítottuk, hogy a minták tisztasága is legalább ennyire fontos kritérium. Az 1 napos embriókból (a kisszámú sejt miatt) hagyományos DNS-tisztítási módszerrel nem sikerült megfelelő mennyiségű DNS-t előállítani a reakcióhoz. Ezért egy egyszerűbb és kisebb veszteséggel járó módszert választottunk, ami viszont gyengébb minőségű templátot szolgáltatott. A 1,5 alatti tisztaságú, fehérjével szennyezett minták a legtöbb primer esetében nem, vagy alig adtak fragmentet. Ugyanígy a minőségbeli eltérések okozhatták az 5 napos embrióknál is a RAPD mintázat „értelmezhetetlen” különbségeit a 2. táblázatban világosszürkével jelölt mezőkben. A RAPD-nál a megfelelő primerek azonosításához akár több száz primer tesztelésére is szükség lehet egy kezelés esetében. A RAPD szemikvantitív adatokat ad és nehezebb számszerűsíteni, ráadásul a fragmentek erősségét (ismételhetőségi problémák miatt) általában nem is vonják be a toxikológiai kiértékelésbe. A Comet assay esetében viszont jól használható szoftverek állnak rendelkezésre, amelyek számos paramétert vesznek figyelembe az adatok számszerűsítése és kiértékelése során.

A Comet assay összességében érzékenyebb, egyszerűbb és megbízhatóbb módszernek bizonyult. A kidolgozott protokollok alkalmazásával jól ismétелhető és értékelhető eredményeket kaptunk. A RAPD ezzel szemben tesztanyagonként újabb és újabb hosszadalmas optimalizálást igényel, ráadásul az eredményt számos tényező befolyásolhatja (pl. DNS megfelelő koncentrációja, tisztasága). Hasonló jellegű vizsgálatokban inkább a Comet assay használatát javasolnánk. Rácz és munkatársai (2012), valamint az általunk kapott eredményeket fontos lenne figyelembe venni, nem csupán a későbbi vizsgálatok tervezésénél, hanem a potenciális humánegészségügyi és környezeti kockázattal kapcsolatban is.

5. Összefoglalás

Az ivóvíz az ember által fogyasztásra alkalmas víz. Vizsgálatok kimutatták, hogy az ivóvízben bizonyos nagyságrendben, a ma ismert analitikai módszerekkel vizsgálva, mintegy 200 különböző kémiai vegyület található, melyek a hagyományos szűrés és kémiai kezelést követően is visszamaradnak. Megvizsgálva ezek szerkezetét, közöttük több olyan vegyületet is találtak, melyek karcinogén, mutagén, teratogén, neurotoxikus vagy immunszuppresszív hatással rendelkeznek. A hatások tanulmányozását modellszervezetek segítségével végzik, amelyekkel szemben mind inkább kritérium az emlős modellek kiváltása más élőlényekkel vagy élő rendszerekkel.

A halak osztálya az egyetlen olyan taxonómiai csoport, amelybe kizárólag vízben élő gerinces fajok tartoznak, ezért nélkülözhetetlen részei az integrált toxikológiai vizsgálatoknak. A halakon belül elsősorban a zebradánióknak (*Danio rerio*) van kiemelt jelentősége a laboratóriumi vizsgálatok szempontjából.

Munkánk során egy víztisztítási melléktermék vegyület, a 4-etil-benzaldehid hatását vizsgáltuk ezen halfaj embrióin. Célkitűzésünk az embriótesztel nyerhető alapvető toxikológiai paraméterek meghatározása, valamint két genotoxicitást vizsgáló módszer, a Comet assay és a RAPD PCR érzékenységeinek összevetése volt.

Az embrió teszt során az LC_{50} és LC_{10} értékeket állapítottuk meg, valamint 72 órával a termékenyülés után fotókon dokumentáltuk az észlelt torzulásokat. A mikroszkópos vizsgálat során megállapítottuk, hogy a 4-etil-benzaldehid már az LC_{10} alatti koncentrációkban is perikardiális ödémát, a farok torzulását, göbyszerű képletek kialakulását, valamint a farok szélének szabálytalan alakulását eredményezi. Szakirodalmi adatok és eredményeink alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a 4-EBA specifikus elváltozásokat okoz a zebradánió embriókon, gátolja a *wnt5* útvonalat, valamint a Ca^{2+} csatorna működését az erek falának simaizom szövetében.

A genotoxicitás vizsgálatánál mind a RAPD, mind pedig a Comet assay kimutatta a 4-EBA genotoxikus hatását zebradánió embriókon. A két módszer közül a Comet assay érzékenyebbnek bizonyult, már a legkisebb koncentrációban (0,5 mg/l) is szignifikáns eltérést mutatott a kontrollhoz képest 1 napos embriók esetében. Ezzel szemben a RAPD eredményei csak magasabb koncentrációkban mutattak hatást. A Comet assay esetében nincs szükség hosszas optimalizálásra az újabb tesztanyagoknál, így összességében megbízhatóbb és egyszerűbb módszernek bizonyult a RAPD-nál.