



INTÉZMÉNYI TUDOMÁNYOS DIÁKKÖRI KONFERENCIA

2022. november 23.

**XENOÖSZTROGÉN ANYAGOK RÖVID- ÉS HOSSZÚTÁVÚ
HATÁSAINAK *IN VIVO* KIMUTATÁSÁRA ALKALMAS
BIOMARKER ZEBRADÁNIÓ VONAL (*CHILI*)
JELLEMZÉSE**

**Characterization of a multicolor transgenic biomarker zebrafish line suitable for
in vivo detecting the short- and long-term effects of xenoestrogens**

Készítette: **Volner Cintia**
HT5NFV
Környezetmérnök, MSc
Nappali tagozat
Szent István Campus

Témavezető: Dr. Csenki-Bakos Zsolt, tudományos
főmunkatárs, Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem,
Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet, Környezettoxikológia
Tanszék

Lehetséges OTDK szekció: Agrártudományi szekció

**Gödöllő
2022.**

Tartalom

1. Bevezetés és célkitűzések.....	1
2. Szakirodalmi áttekintés	4
2.1. Ösztrogénhatású anyagok a környezetünkben.....	4
2.1.1. Az ösztrogénhatású anyagok jellemzése	5
2.2. A kísérletben felhasznált vegyületek jellemzése	6
2.2.1. 17- β -ösztradiol.....	6
2.2.2. 17- α -etinil-ösztradiol.....	6
2.3. Az analitikai vizsgálatok lehetőségei az EDC-k vizsgálatában.....	6
2.4. Biológiai vizsgálatok lehetőségei az ösztrogénhatás kimutatására	7
2.5. Halmodellek szerepe az ösztrogénhatású anyagok vizsgálatában	8
2.5.1. Zebradánió, mint tesztorganizmus	9
2.5.2. Biomarker és mutáns zebradánió vonalak	9
2.6. Az ovotestis kialakulása halakon.....	10
3. A vizsgálatok módszerei.....	14
3.1. A vizsgálatok helyszíne.....	14
3.2. A <i>Chili</i> vonal előállításához használt zebradánió vonalak jellemzése	14
3.2.1. Tg(vtg1:mCherry).....	14
3.2.2. Casper (roy-/-;nacre-/-).....	14
3.2.3. Tg(β act:YFP).....	15
3.3. A kísérletekben alkalmazott zebradánió vonalak tartási körülményei	16
3.4. A szaporítás és ikranyerés folyamata	17
3.5. A <i>Chili</i> vonal egyedfejlődésének vizsgálata	17
3.6. Rövid távú vizsgálatok menete.....	18
3.6.1. Rövid távú hatások vizsgálata embriókon	18
3.6.2. A máj fejlődésének vizsgálata	20
3.6.3. Az mCherry fehérje termelődésének vizsgálata adult hím egyedekben	21
3.7. Az EE2 hosszútávú hatásainak vizsgálata adult <i>Chili</i> hímeken	21
3.7.1. A herék méretében bekövetkező változások nyomon követése	21
3.8. Állatvédelem	22
4. Eredmények és értékelésük	23
4.1. <i>Chili</i> vonal egyedfejlődésének dokumentálása.....	23

4.2.	Rövid távú kezelések hatásainak vizsgálata	25
4.2.1.	Rövid távú vizsgálatok eredményei embriókon	25
4.2.2.	A Chili és a <i>vtg1:mCherry</i> embriók májfejlődésének összehasonlítása	28
4.2.3.	Az mCherry fehérje termelődésének változása EE2 kezelt adult hím egyedekben.....	30
4.3.	Hosszú távú hatások vizsgálata <i>Chili</i> hímeiken.....	31
4.3.1.	A herékben bekövetkező változások nyomon követése	31
4.3.2.	Az ovotestis megjelenésének vizsgálata.....	31
5.	Következtetések és javaslatok	33
6.	Összefoglalás.....	35
7.	Köszönetnyilvánítás	37
8.	Irodalomjegyzék.....	38
9.1.	Felhasznált szakirodalom	38
9.2.	Internetes hivatkozások	40

1. Bevezetés és célkitűzések

A környezetünkbe kikerülő veszélyes vegyületek között nagy számban találunk EDC (Endocrine Disrupting Compounds – Endokrin Rendszert Károsító) vegyületeket, elsősorban ösztrogénhatású anyagokat, melyek a természetes közegek közül legnagyobb mértékben a vizet szennyezik. A csoportba tartozó anyagok kémiai sokfélesége megnehezíti a vizsgálatukat, mivel különböző analitikai módszerek szükségesek kimutatásukhoz, ráadásul az EDC-k a környezetben keverékek formájában vannak jelen, amely tovább bonyolítja a mérésüket. Ezt a problémát hidalják át a hatásoldalról vizsgáló módszerek, például a különböző biomonitor/bioindikátor szervezetek használatán alapuló vizsgálatok.

A halak az egyetlen olyan gerinces csoport, amelyek a teljes életciklusukat a vízben töltik, így fokozottan ki vannak téve a vizes környezetet érintő szennyezések hatásainak, ideértve az EDC vegyületek hatásait is. Az ösztrogénhatású anyagoknak számos káros hatása van halakon a hormonrendszer megzavarásán keresztül, egyén szintjén ilyen például az immunrendszer hatékonyságának csökkenése, fejlődési rendellenességek kialakulása, a reprodukív rendszer működési zavara (pl. hímek vitellogenin termelése), hosszútávon petesejtfejlődés kialakulása a hereszövetben (ovotestis), amelyek a termékenység csökkenéséhez és a szexuális viselkedés megváltozásához vezethetnek. Az ovotestis kialakulását, más EDC biomarker vizsgálatokkal szemben (pl. vitellogenin mérés), csak az állat feláldozásával lehet jelenleg vizsgálni és ez számos problémát vet fel mint például: nem lehet folyamatában vizsgálni a tünetek kialakulását, illetve az állat elpusztítása további állatvédelmi kérdéseket vet fel.

A komplex ökotoxikológiai és környezeti kockázatbecsléshez köthető elemzések kihagyhatatlan részei a haltesztek, amelyek legnépszerűbb alanya a zebradánió (*Danio rerio*). A vad típusú zebradánió állományok mellett a mutáns és transzgenikus vonalak toxikológiai célú felhasználása is ismert, közülük a specifikus választ adó biomarker/bioindikátor vonalak alkalmazása a legperspektivikusabb, ezekből azonban nagyon kevés áll rendelkezésre.

Nagy lehetőségeket hordoz azonban magában az a mutáns vonal (*Casper*), amely nemcsak embrióként, hanem felnőtt korban is transzparens marad. Segítségével olyan vizsgálatok is megvalósíthatóvá válnak, amelyekre az embriók még nem alkalmasak. Kialakíthatók lehetnek pl. olyan biomarker transzgenikus vonalak, melyek segítségével fluoreszcens mikroszkóp alatt *in vivo* is vizsgálhatóvá válnak a xenobiotikumok okozta szervi elváltozások az átlátszó testen belül (pl. az EDC okozta petesejtfejlődés a hereszövetben). Az elmúlt két évben a *Casper* vonal speciális tulajdonságaira alapozva, egy olyan dupla recesszív

mutációt tartalmazó multikolor transzgenikus biomarker zebradánió vonalat ($roy^{-/-};nacre^{-/-}$ /Tg(*vtg1*:mCherry;*βact*:YFP)= *Csili*(*Chili*) hoztak létre a tanszék dolgozói, amely segítségével nemcsak a xenoösztrogén akut hatása vizsgálható *in vivo*, hanem nagy valószínűséggel nyomon követhető az EDC-k okozta petesejtfejlődés kialakulása is a hereszövetben szintén az állat feláldozása nélkül.

A modell létrehozásánál a klasszikus keresztezési eljárás mellett döntöttek egy teljesen új transzgenikus vonal előállítása helyett, amelyet a pigmentmutáns vonal érzékenysége miatt ítélték célravezetőbbnek. A modell, amely a *Chili* fantázianevet kapta, kialakításában 3 zebradánió vonal került felhasználásra:

- *Casper* ($roy^{-/-};nacre^{-/-}$): Adult korban is transzparens pigmentmutáns vonal, melyben *in vivo* megfigyelhetők a belső szervek a hasfalon keresztül.
- Tg(*vtg1*:mCherry): A tanszék saját előállítású ösztrogénhatás biomarker zebradánió vonala, amely ösztrogénhatású anyagok jelenlétében fluoreszcens fény hatására vörös izzással jelez a máj területén (*in vivo* modell).
- Tg(*βact*:YFP): A vonal egyedeinek minden sejtjében sárga színnel expresszál a transzgén, azonban a fiatal fejlődési stádiumú oocytákban az izzás mértéke kb. 10-100x nagyobb, mint más sejtek esetében, így kiválóan alkalmas petesejt markernek.

A dolgozat elkészítése során céljaim a következők voltak:

- Célom volt a *Chili*, mint multicolor biomarker transzgenikus, dupla recesszív mutáns vonal egyedfejlődésének jellemzése, amely magában foglalta egy életciklus atlasz elkészítését.
- Célul tűztem ki az ösztrogénhatású vegyületeknek a *vtg1*:mCherry transzgén expressziójára gyakorolt akut hatásának *in vivo* vizsgálatát a *Chili* vonal embrióin, illetve adult hímjein.
- Kíváncsi voltam arra, hogy a különböző xenoösztrogénekre milyen érzékenységgel rendelkeznek a *Chili* embriók a vonal kialakításnál használt *vtg1*:mCherry keresztezési partner embrióihoz képest.
- A *Chili* vonal nem csak a toxikológia, hanem a fejlődésbiológia területén is felhasználható lehet, a két kutatási irány azonban eltérő inkubálási hőmérsékletet ír elő a vizsgálatok során. Ebből kiindulva fel kívántam deríteni azt, hogy van-e különbség a mCherry fehérje kifejeződésében az ugyanazon kezelésnek kitett, de eltérő inkubálási hőmérsékleten tartott *Chili* embriók között.

- Igazolni kívántam azt, hogy a *Chili* vonal valóban alkalmas az ovotestis kialakulásának *in vivo* vizsgálatára, illetve a hosszútávú ösztrogénkezelések hatására bekövetkező szervi elváltozások nyomonkövetésére.

2. Szakirodalmi áttekintés

2.1. Ösztrogénhatású anyagok a környezetünkben

A víz az egyik legfontosabb természeti erőforrásunk, melynek védelmére fokozottan ügyelnünk kell, azonban jelenleg a felszíni víztestek többsége már nem éri el a jó ökológiai állapotot. A rájuk nehezedő terhelések főként antropogén forrásokból (1. ábra) kerülnek elsősorban szenny- illetve talajvizekbe, onnan pedig a természetes vizekbe. Megkülönböztethetünk pontszerű (pl. szennyvízbemenet) és diffúz (pl. mezőgazdasági terület) forrásokból származó szennyezést (http 1). A fő szennyezőanyagok között találhatunk endokrin rendszert megzavaró vegyületeket (Endocrine Disrupting Compounds) is, melyeket EDC anyagoknak nevezünk.



1. ábra: Ösztrogén hatású anyagok útja a természetes vizek és az ivóvíz felé. Expoziációs útvonalak: hulladéklerakók (1), szennyvíztisztító telepek (2), ipari létesítmények (3), háztartások és kórházak elfolyó vizei (4), állattartó telepek (5) vagy szántóföldek, gabonátárolók (6) (Csenki-Bakos, 2014)

Az EDC vegyületek olyan exogén ágensek, amelyek zavarják az állatok és az emberek endokrin rendszerének normális működését (Scholz és Klüver, 2009). A vízi környezetben található EDC-ket világszerte széles körben tanulmányozták az elmúlt évtizedekben, mivel potenciális egészségügyi kockázatot jelentenek a vízi szervezetekre és az emberekre (Gong et al., 2016). Ilyen hatások például a vitellogenezis megjelenése, a hermafrodizmus és a feminizáció a hím halakban, emberben pedig az exponenciálisan növekvő prosztata-, emlő- és hererák előfordulása (Liu et al., 2011) is kapcsolatba hozható ezekkel a

vegyületekkel. Az EDC-k közül az ösztrogén tulajdonságokkal rendelkező vegyületek kerültek leginkább a figyelem középpontjába. A jelenleg alkalmazott szennyvíztisztítási technológiák sajnos nem, vagy csak kis mértékben képesek eltávolítani ezeket az anyagokat, így egy részük az ivóvízben is megtalálható. Az ivóvízben kimutatott EDC típusú szennyezők között előfordulnak természetes hormonok (fitoösztrogének) és mesterséges eredetű ösztrogének (xenoösztrogének) melyek lehetnek: ipari alapanyagok (PCB-k, ftalátok, dioxionok), valamint gyógyszerek (pl.: fogamzásgátló tabletták hatóanyagai) és növényvédő szerek (pl.: atrazin, DDT és bomlástermékei) (Zákányiné & Muránszky, 2013).

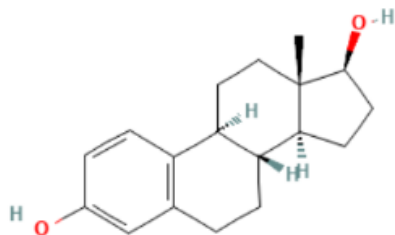
2.1.1. Az ösztrogénhatású anyagok jellemzése

A xenoösztrogének kémiai struktúrájukban nagy változatosságot mutatnak, mind a talajban, vízben és levegőben előfordulnak, ezért is használatos rájuk az: „ubiquiter” (mindenütt jelen lévő) kifejezés (Gubó et al., 2019). Különösen ellenállóak mind a biológiai mind a kémiai hatásoknak és elsősorban a nagy zsírtartalmú szövetekben halmozódnak fel (Mackay et al., 2000), ezért POP (Persistent Organic Pollutant) vegyületekként is számon tartják őket. Hatásmechanizmusuk közé sorolhatók a direkt hormon agonizmus/antagonizmus, hormon receptorok megváltoztatása és az endogén hormonszintek módosítása. EDC vegyületekként többségük az ösztrogénhez hasonló változást/hatást idézhet elő a szervezetben (Soto et al., 1995).

Míg a xenoösztrogének az elmúlt évtizedek alatt kerültek a környezetbe, addig a fitoösztrogének mindvégig a bioszféra szerves részei voltak. Ezek olyan növényi eredetű vegyületek, melyek képesek az ösztrogén receptorokhoz kötődni és hasonló hatásokat kiváltani, azonban hatásfokuk kisebb, mint az antropogén ösztrogéneké. Napjainkban ma is folyamatos expozíciónak vagyunk kitéve a különböző hüvelyesek és a teljes kiőrlésű termékek fogyasztása által. Élelmiszereinkben a legnagyobb mennyiségben jelenlévő fitoösztrogének a következők lehetnek: lignánok, melyek a legtöbb növényben is előfordulnak, illetve izoflavonoidok, melyek főként hüvelyesekben találhatók meg (Adlercreutz és Mazur, 1997). Azonban míg a mesterséges ösztrogének bioakkumulálódnak és raktározódnak a szervezetben, addig a fitoösztrogének gyorsan kiválasztódnak (Manach, 2004).

2.2. A kísérletben felhasznált vegyületek jellemzése

2.2.1. 17- β -ösztradiol

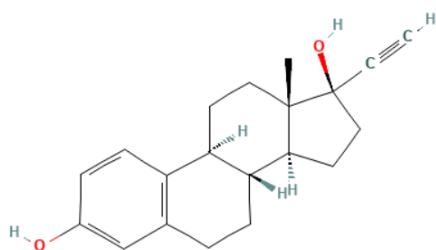


2. ábra: E2 szerkezeti képlete

(<http> 2)

A 17- β -ösztradiol (2. ábra) (más néven E2, két hidroxil csoportja miatt) egy szteroid hormon és a legfontosabb női nemi hormon. Az E2 felelős a női másodlagos szexuális jellemzők kialakulásáért, szerepet játszik a reprodukív szövetek kialakulásában és fejlődésében, az ivari ciklus kialakításában és fenntartásában (Ryan, 1982). Számos más, nem reprodukív szövetben is kimutatható ide értve a csontszövetet, zsírszövetet, bőrszövetet, májat és az agyat.

2.2.2. 17- α -etinil-ösztradiol



3. ábra.: EE2 szerkezeti képlete

(<http> 3)

A 17- α -etinil-ösztradiol (EE2) (3. ábra), az ösztradiol szintetikus származéka, orálisan adagolva aktív ösztrogén. A modern fogamzásgátló tabletták fő hatóanyaga. Hatásmechanizmusa alapján ösztrogénreceptor agonistának nevezhetjük, hiszen az ösztrogénreceptor komplexhez kötődve belép a sejtmagba, aktiválva az ösztrogén sejtválaszokban részt vevő gének DNS transzkripcióját. Az epididimális (mellékhere) szövetben gátolja az 5-alfa-reduktázt, így vezetve a tesztoszteronszint csökkenéséhez, ezzel csökkentve a prosztatatarák progresszióját. Daganatellenes hatása mellett, véd a csontritkulás ellen is. Félszintetikus ösztrogénként is számon tartják, hiszen természetes formában is megtalálható bizonyos növényfajokban (pl.: *Origanum syriacum*, *Origanum sipyleum*) (<http> 3).

2.3. Az analitikai vizsgálatok lehetőségei az EDC-k vizsgálatában

Mivel az EDC vegyületek kémiai struktúrájuk alapján igen eltérő és változatos vegyületek, ezért különféle analitikai eljárásokra van szükség a kimutatásukhoz. Azonban az ilyen módszerekkel nem állapítható meg, hogy ezek a vegyületek ösztrogénként tudnak-e működni a szervezetben és további nehezítő tényező, hogy a környezetben számos más anyag

is jelen van, melyek nagy mértékben befolyásolhatják a hatásukat (Wright-Walters és Volz, 2009).

Általánosságban elmondható, hogy a tömegspektrometriát (MS) alkalmazó tömegalapú módszerek nagy érzékenységűek és viszonylag alacsony kimutatási határt mutatnak más módszerekhez képest (Chang et al., 2009). További elterjedt analitikai módszerek közé sorolhatók az extrakción alapuló módszerek, illetve az ezek párosításán alapuló módszerek, mint például: nagy teljesítményű folyadékkromatográfia (HPLC), gázkromatográfia-tömegspektroszkópia (GC/MS), gázkromatográfiával kapcsolt tandem tömegspektroszkópia (GC-MS/MS), folyadékkromatográfiával kapcsolt tandem tömegspektroszkópia (LC-MS/MS) (Kerdivel et al., 2013). Míg az ELISA módszerrel (antigén-antitest kölcsönhatáson alapuló, biológiai módszer) meghatározott minták észlelési határa 20 és 40 ng/l közé tehető, addig GC-MS/MS technikával ez az érték csupán 0,05-2,4 ng/l (Chang et al., 2009). Mivel a minták így még mindig nem alkalmasak közvetlen vizsgálatra, így mérés előtt a vizsgálandó anyagot akár több százszorosára is töményíteni kell és valamilyen fázison meg kell kötni. Ezeket általában folyadék-folyadék (LL) vagy szilárd fázisú extrakcióval (SPE, SPME, SBSE) végzik (Csenki-Bakos, 2014).

Annak ellenére, hogy a különböző analitikai módszerek segítségével meg tudjuk határozni a vegyületek koncentrációit, ezek egymásra gyakorolt hatásairól, egymást erősítő/gyengítő tulajdonságairól élettani hatásairól nem jutunk információhoz. Így megfelelően érzékeny indikátor szervezetek (pl. halak, kételtűek) alkalmazására is szükség van, a biológiai vizsgálatok elengedhetetlen részei ezen vegyületek mérésének (Zákányiné & Muránszky, 2013).

2.4. Biológiai vizsgálatok lehetőségei az ösztrogénhatás kimutatására

A biológiai vizsgálatok közé sorolhatjuk az *in vitro* illetve *in vivo* tesztrendszereket. Az *in vitro* kifejezés olyan kísérleti technikára utal, mely ellenőrzött körülmények között zajlik le (pl.: kémcső) és jellemzően nem az élő szervezetben megy végbe. Jellemzően sejtekkel, szövetekkel, szervekkel és biomolekulákkal dolgoznak. Ösztrogénhatásnál elsősorban a receptorkötődés, majd a receptor konformációs változása általi jelátviteli kaszkád elindítása, végül pedig az ösztrogénérzékeny gének átíródása történik meg. Az ilyen módszerek már a komplexebb környezeti minták ösztrogén hatásának kimutatására is alkalmasak (Csenki-Bakos, 2014). Ilyen, *in vitro* vizsgálatok közé sorolható például a YES-teszt, melynél a tesztorganizmus egy genetikailag módosított, rekombináns élesztő faj (*Saccharomyces cerevisiae*), illetve a

BLYR (Bioluminescent Yeast Reporter) módszer, melynél a törzsvonalba integrálták a fénykibocsátáshoz szükséges lux kazettát tartalmazó plazmidokat. A BLYR esetében a törzs alapállapotban is rendelkezik fénykibocsátó képességgel, de amint valamilyen citotoxikus anyag éri a törzset, egy gátló folyamat indul meg a fénykibocsátás terén (Háhn, szóbeli közlés).

In vivo vizsgálatoknál általában hosszabb és költségesebb eljárásokról beszélünk. Ezek a tesztrendszerek már alkalmasak a szervezetben lezajló komplex folyamatok elemzésére, jellemzésére. Egészen a legegyszerűbb testfelépítésű állatoktól (és növényektől) a legfejlettebb idegrendszerrel rendelkező egyedek is a kísérlet részévé váltak. Jellemzően szaporodási viselkedést, termékenyülési sikerességet, morfológiát, vitellogenin termelést stb. vizsgálnak (deFur 2004, Jobling et al., 2004). További jelentős áttörést jelentett a transzgén technológia és a fluoreszcens fehérjék alkalmazása, melyek segítségével *in vivo* is tanulmányozható egy meghatározott gén aktiválódása (Pakhomov & Martinov, 2008). A biomarker vonalak (esetünkben ösztrogénhatást kimutató) indikátor szervezetként működve alkalmasak a komplex környezeti minták vizsgálatára, dózis-hatás vizsgálatokra. Felhasználásuk megoldást jelenthet az analitikában felbukkanó problémák kiküszöbölésére (Bakos et al. 2019; Csenki et al. 2020).

2.5. Halmodellek szerepe az ösztrogénhatású anyagok vizsgálatában

Annak ellenére, hogy széles körben elismerik, hogy a környezetbe kikerülő különböző antropogén anyagok károsak lehetnek mind az emberre, mind az ökosztisztémára, korlátozott ismereteink vannak arról, hogy hány ilyen vegyület van hatással az egészségre, illetve okozhat egészségkárosodást. A viszonylag rövid életciklussal rendelkező halfajok a legkedvezőbbek a teljes életciklusra vonatkozó megközelítésekhez, mivel alkalmazásuk lerövidíti a fejlődésre vonatkozó kísérleti vizsgálatok időtartamát és a szaporodás vizsgálatát, így ezek a kísérletek kezelhetőbbé és költséghatékonyabbá válnak.

Az endokrin rendszert károsító vegyületek vizsgálatára szolgáló fajok egyike a zebradánió (*Danio rerio*) is, mivel a megtermékenyítéstől a szaporodási stádiumig mindössze három hónap alatt ivaréretté válik és egész évben ösztönözhető a szaporodásra (Fenske et al., 2005). A zebradániók szexuális differenciálódása különbözik más, az endokrin károsító vegyületek vizsgálatára használt fajoktól, mint például (*Pimephales pimephales*) vagy a medaka (*Oryzias latipes*) abban, hogy nem differenciált „gonochoristaként”, hanem "juvenilis hermafroditaként" vagy differenciálatlan „gonochoristaként” fejlődik, tehát a két nem később különül el egymástól (Maack & Segner, 2003). Az ontogenezis (egyedfejlődés) során a zebradániók, függetlenül a genetikai nemtől, egy nem funkcionális nőtény fázison mennek

keresztül, amikor a fejlődő gonádok kizárólag az elsődleges növekedési stádiumban lévő petesejtekből állnak. A nem funkcionális petefészkek később funkcionális petefészkekké vagy herékké alakulnak át. A gonádok átmeneti szakasza az ösztrogénérzékenység kritikus időszaka: ebben az időszakban expozíciónak kitett halak petesejt termelése és későbbiekben megtermékenyülése jelentősen csökkent, míg a korai stádiumban (hermafrodita szakasz) kezelt halak szaporodási képességére nem volt jelentős hatással (Maack & Segner, 2004).

2.5.1. Zebradánió, mint tesztszervezet

A zebradánió (*Danio rerio*) a pontyalakúak (*Cypriniformes*) rendjébe és a pontyfélék (*Cyprinidae*) családjához tartozik. Trópusi, édesvízi hal, eredetileg Indiában őshonos; megtalálható Banglades, Nepál, Burma és Gangesz régióiban. Patakok, csatornák, árkok, tavak és lassan csordogáló folyók, rizsföldek biztosítanak neki élőhelyet. Számos pozitív tulajdonsággal rendelkezik, ilyenek például: kis termete, békés természete, rövid generációs ideje, nagy mennyiségű ivarterméke. A zebradániók a toxikológiai kutatások élvonalában állnak; széles körben alkalmazzák a vízminták toxinjainak kimutatására, valamint a környezeti xenobiotikumok és a hozzájuk kapcsolódó betegségek hatásmechanizmusainak vizsgálatára. Mára már az OECD által is javasolt toxikológiai modellállat lett (Csenki-Bakos, 2014).

2.5.2. Biomarker és mutáns zebradánió vonalak

Bár a vad fenotípusú zebradániót széles körben alkalmazzák a különböző környezeti szennyeződések toxicitásának feltérképezésére, számos olyan tulajdonságuk van, melyek nem feltétlen előnyök bizonyos vizsgálatok elvégzésekor. Ilyen például a teljesen pigmentált test (adult korban), melynél az állat feláldozása nélkül nem jutunk információhoz a belső szervi elváltozások terén.

Napjainkban azonban már a transzgenikus és mutáns zebradániók felhasználásával ez sikeresen kiküszöbölhető. A fluoreszcens fehérjét expresszáló transzgenikus halak sikeres kifejlesztésével a zebradánió modell kiemelkedő tesztszervezetté vált a környezeti monitorozás területén. A fluoreszcens fehérje, mint riportergén, heterológ sejtekben expresszálható, ezen kívül könnyen kimutatható toxicitás nélkül is. Más invazív módszerek helyett, egy olyan alternatívát nyújt, melynél az állat elpusztítása nélkül végezhetők el különböző kísérletek. Emiatt a fluoreszcens vagy biolumineszcens fehérjét széles körben alkalmazzák transzgenikus állatok tanulmányozására. Amennyiben a promóter permanensen bekapcsolva tartja a riportert, akkor olyan vonalak tervezésére is lehetőség van, amelyekben adott sejtek vagy szervek permanensen kifejezik a riportert jelét. Így némely vegyületek egyes célszervekre gyakorolt

káros hatása is vizsgálható. Biomarker vonalak hozhatók létre, indukálható promóterek segítségével. Ezekben a biomarker vonalakban a jel, egy külső inger (pl. ösztrogén) hatására aktívvá válik, így akár indikátor szervezetként és koncentrációfüggő, dózis-hatás értékelésekre, elemzésekre is megfelelőek. Fontos, hogy a riportergének szabályozható módon kifejezhetőek, illetve hogy potenciálisan érzékenyek legyenek (Csenki-Bakos, 2014).

Jelenleg a Nemzetközi Zebradanió Adatbázisban (ZIRC) 44208 transzgenikus vonalat tartanak nyilván (2022.10.05.), ez majdnem a duplája a 2014-ben mért adatokhoz képest. Az újabb technikák lehetőséget kínálnak arra, hogy az enzim aktivitást *in vivo* elemezzék. Amennyiben egy toxikus anyag jelen van, az enzim átíródik és feldolgozza a jelenlévő szubsztátot, ezáltal mérhetővé téve a jelet, mely fluoreszcencia alapján mérhetővé válik. A riportergének működéséhez csupán az alkalmas energiájú fotonokat kell szolgáltatni, így fluoreszcens szűrők használatával mikroszkóp alatt *in vivo* vizsgálható. Egymással nem átfedő emissziós és abszorpciós spektrumú fluoreszcens fehérjék használata miatt olyan vonalak kifejlesztése is lehetővé vált, amelyekben a különböző fehérjék expressziója, ugyanabban az egyedben egymástól függetlenül tanulmányozható (Yang et al., 2009).

2.6. Az ovotestis kialakulása halakon

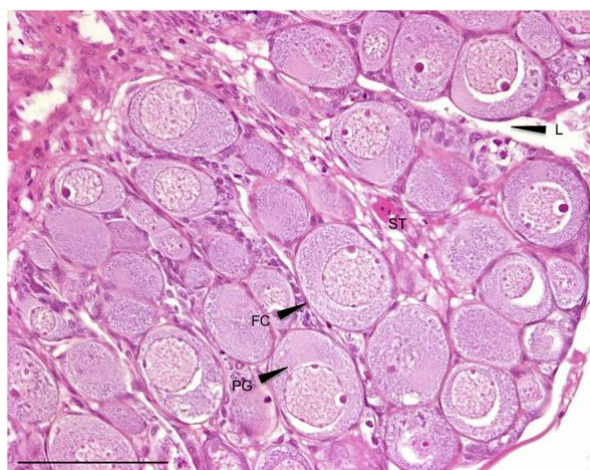
A xenoösztrogének környezetben való előfordulására és hatásaira irányuló kutatásokban nemcsak rövidtávú, hanem hosszútávú vizsgálatok is szükségesek a kockázatuk pontosabb feltérképezéséhez. A halak endokrin rendszerének zavarával kapcsolatos korábbi, rövid- és hosszútávú kezeléseket vizsgáló tanulmányok kimutatták, hogy az állatok EE2-nek való kitettsége a máj vitellogenin szintézisének és a gonadoszomatikus indexnek (GSI-Gonadosomatic Index) változását idézte elő (Kime, 1995). A GSI a halak szaporodási állapotának meghatározására szolgál, egyfajta „termékenységi mutató”.

Mindazonáltal ritkábban számolnak be az EE2 a tüszők mennyiségi termelésére gyakorolt hatásairól, illetve az általa indukált vitellogén növekedésére a petefészekben. A vitellogenin, mint a vitellin nevű szikfehérje előanyaga, normális esetben csak a nőstényekben termelődik válaszul a petefészekből származó ösztrogének hatására. A hím halak általában nem szintetizálnak vitellogenint, mivel a hímeknek nagyon alacsony (gyakran kimutathatatlan) a keringő ösztrogének koncentrációja. Ugyanakkor a hím egyedek ugyan úgy reagálnak az exogén ösztrogénekre, ezért a vitellogenin jelenlétét a plazmában a hím halaknál biomarkerként használják fel, így kimutatva a környezeti mintákból az ösztrogén hatású anyagokat. A molekuláris biológiai kutatások vitellogenin mRNS kimutatására szolgáló módszereket

fejlesztettek ki mint például ELISA és az RT-PCR (Burki et al., 2013) vizsgálatok, ezekkel a módszerekkel könnyen ki lehet mutatni az ösztrogénhatást és akut vizsgálatoknál is jól alkalmazhatóak.

A megnövekedett xenoösztrogénszint megzavarhatja a spermatogenezist és csökkentheti a here méretét (Almeida et al., 2017), megzavarja a spermatogóniák mitózisát (Chieffi et al., 2002) és gátolja a spermiumok képződését (Verderame et al., 2107). Különböző halfajoknál kimutatták, hogy a gonádok fejlődésének kritikus időszakában az exogén hormonok adagolása felülírhatja az endogén nemi meghatározó/differenciáló mechanizmusokat a fejlődő szervezetben, lehetővé téve fenotípusos nemek indukcióját, megfordítását. Tekintettel arra, hogy az egyik nem piacképesebb lehet, ezért ezt a gyakorlatot ma már gyakran alkalmazzák a haltenyésztésben az egynemű egyedek előállításához, populációk létrehozásához (Mylonas et al., 2010).

A természetes élőhelyeken különösen nagy veszélyt jelentenek az ökoszisztémára, így a halpopulációra is azok a felszíni befogadó vizek, melyekbe a szennyvíz valamilyen formája torkollik. A jelenlegi szennyvízkezelési technológiák nem biztosítják kellőképpen sem a természetes, sem a mesterséges eredetű ösztrogének lebomlását (Ternes et al., 1999). A laboratóriumi kísérletek során több publikáció született a halak endokrin rendszerének károsodásáról, hím halak „elnőiesedéséről” és a szaporodási képességről különböző ösztrogénhatás következtében (Campbell & Hutchinson, 1998) és ma már egyre több információ áll rendelkezésünkre arról is, hogy ezen anyagok milyen hatással vannak a vadon élő populációkra krónikus kitettség következtében.



4. ábra: Hímnemű szivárványos pisztráng heréjének keresztmetszete, melyet krónikus 1 mg/l-es EE2 koncentrációnak tettek ki 76 napig; FC: tüszősejt; PG: elsődleges növekedési petesejt; L: lamella; ST: alapszövet (sztróma) (Depiereux et al., 2014)

Depiereux és társai egy olyan tanulmányt végeztek el 2014-ben, melynél szivárványos pisztráng (*Oncorhynchus mykiss*) ivadékokat neveltek különböző koncentrációjú etinil-ösztadiol (EE2) expozíció alatt. A töményebb oldatoknak kitett halak jelentősen alulmaradtak növekedés és súlygyarapodás terén, mint kontroll társaik. Szignifikánsan az 1 és 10 mg/l-es koncentrációnak kitett halak mérete és súlya jelentősen csökkent. 76 nap elteltével jól megfigyelhető volt az ovotestis (here- és petefészekszövetet egyaránt tartalmazó ivarszerv) megjelenése a hereszövetben (4. ábra) (Depiereux et al., 2014). Az oocyták számától és érési stádiumától függően a tanulmány 3 kategóriába osztotta őket:

- Ovotestis 1: normális és abnormális hereszerkezet, melyek petefészek lamellákra emlékeztető hólyagokat tartalmaznak. Nem láthatóak nagy previtellogén tüszők, de a csírasejtek meiotikus stádiumban láthatók. A gonádok többsége normális heremorfológiát mutat, a legtöbb spermiumsejt (gonocytá) a spermatogoniumban van. A női ivarszervek tekintetében az ovotestis 1 nagy hasonlóságot mutat a korai petefészek fejlődési szakaszának morfológiájához.
- Ovotestis 2: izolált petesejtek jelenléte az abnormális hereszerkezetben. Az oocyták primer oocyták jellemzőit mutatják, jól megfigyelhetők a previtellogén tüszők. A diplotén fázistól kezdődően az oocytákat korai follikuláris sejtek veszik körül (Grier et al., 2007). Szétszóródnak a gonocyták között, bár a legtöbbjük elsősorban a here perifériás részén találhatóak meg. Az oocyták nem úgy helyezkedtek el a petefészek lamellái között, mint ahogy az a petefészkekre jellemző.
- Ovotestis 3: az ivarmirigyek két részre választódnak szét; egy petefészek- és egy here-részre. Ez utóbbi abnormális morfológiát mutat. Itt találhatunk elsődleges növekedési stádiumban lévő oocytákat, egyes egyedeknél pedig érett stádiumban is előfordulnak, melyek nagy mennyiségű vitellogenint is tartalmaznak (Depiereux et al., 2014).

Masanori és munkatársai egy hasonló vizsgálatot végeztek 2001-ben adult medakákon (*Oryzias latipes*), melyet szintén EE2-nek tettek ki 21 napig a következő koncentrációkon: 32,6; 63,9; 116; 261 és 488 ng/l. Mivel ez a faj a számára optimális környezeti tényezők és megfelelő táplálás mellett naponta akár 10 ikra leadására is képes, ideális a reprodukív rendszerre gyakorolt toxikológiai kutatásokhoz. Elsősorban a halak szaporodási képességét, ivarmirigyek állapotát és a vitellogenin indukciót vizsgálták. A három hetes expozíció alatt a koncentráció növekedésével az állatok termékenysége csökkent, 116 ng/l koncentráció felett szignifikáns különbséget mutattak ki. A 448 ng/l-es koncentrációnak kitett kezelési csoportban minden teljes

egyednél a termékenység drámai csökkenését figyelték meg 6 napos kitettség után (feltehetően az anyag toxikussága miatt), és az ezt követő időszakban a kezelt halak már egyáltalán nem termeltek ikrát. A kontroll hímekben a vitellogenin koncentrációja nem volt kimutatható (<18,9 ng/mg a májban), míg az 17- α -etinil-ösztradiollal kezelt halak esetében 63,9 ng/l-től ez az érték is szignifikáns különbséget mutatott. Szövettani elemzések az ovotestisek termelődését is kimutatták ennél a koncentrációnál (33%-os gyakorisággal), a 116 és 261 ng/l oldatoknál ez a gyakoriság elérte a 88%-ot. A legnagyobb töménységű oldatnál (448 ng/l) a két here közül csak az egyikben figyeltek meg ovotestist és szinte az egész kötőszöveti terület abnormális elváltozásokat mutatott. A spermiumok és spermatocyták száma is drasztikusan lecsökkent a kezelt állatokban a kontroll egyedekhez viszonyítva (Seki et al., 2002). Mivel az ovotestis csak az állat feláldozása után vizsgálható, ezért az *in vivo* kimutatásukra alkalmas halvonalak létrehozása fontos előrelépést jelenthet az erre irányuló kutatásokban.

3. A vizsgálatok módszerei

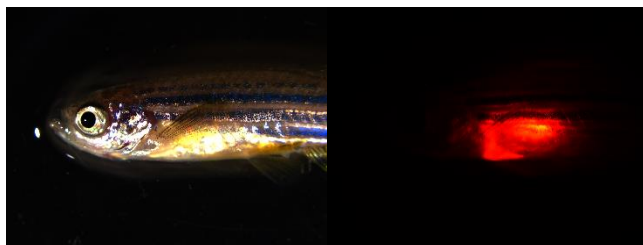
3.1. A vizsgálatok helyszíne

A kísérleteimet a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetemen, a Szent István Campuson az Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet Környezettoxikológia Tanszékének laboratóriumában végeztem.

3.2. A *Chili* vonal előállításához használt zebradánió vonalak jellemzése

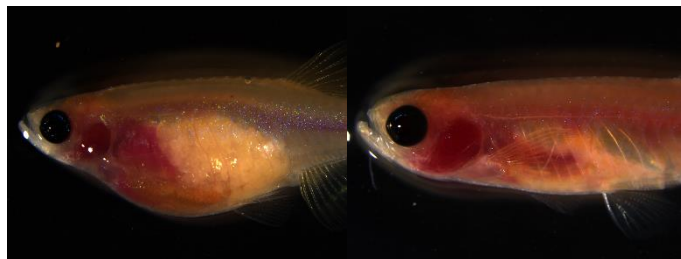
3.2.1. Tg(vtg1:mCherry)

Vitellogenin transzgenikus zebradánió vonal. Vitellogenin promóter által irányított, fluoreszcens fehérjét (mCherry; gerjesztési hullámhossz: 587 nm, kibocsátási hullámhossz: 610 nm) kifejező biomarker vonal, mely alkalmas a xenobiotikumok vagy vízminták ösztrogénérzékenységének meghatározására, az ösztrogének vitellogenin promóterre ható indukált fluoreszcens jel kifejeződése által, így ösztrogén hatású anyagok jelenlétében a májban vörös fluoreszcens fehérje termelődik. Normál esetben csak az ikrás halakban működnek a vitellogenin gének, azonban ösztrogén hatására a hímekben (5. ábra) és a lárvákban is aktiválódnak. A vonal nem csak ösztrogénhatások vizsgálatára alkalmas, hanem segítséget nyújt a fejlődési rendellenességek, májkárosító anyagok vizsgálatában is.



5. ábra: 100 ng/l EE2-vel megkezelt adult hím Tg(vtg1:mCherry) vonal, 96 órás expozíció után

3.2.2. Casper (roy-/-;nacre-/-)

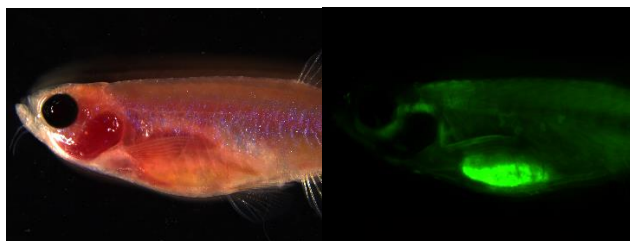


6. ábra: Bal oldalon ikrás, jobb oldalon tejes Casper sima fénymikroszkópos felvétele

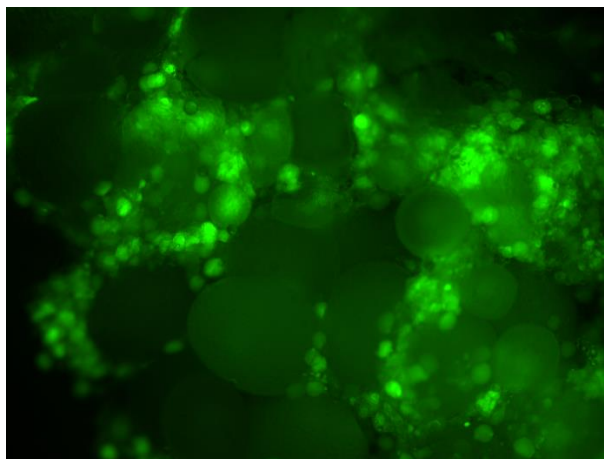
Adult korban is transzparens pigmentmutáns vonal (6. ábra), melyben *in vivo* megfigyelhetők a belső szervek a hasfalán keresztül. Széles körben használják a tumorbiológiai kutatásoktól az idegtudományig terjedő vizsgálatokban. A *Caspt* két recesszív pigmentmutáns vonal szelektív tenyésztésével hozták létre: a gyöngyházdánió (nacre), amely a *mitfa* gén inaktiváló mutációját tartalmazza, így a halak mentesek a pigmentált melanocitáktól, azaz olyan speciális sejtektől, melyek a bőr és a szem pigmentációjáért felelős melanin pigmenteket termelnek. A másik vonal a *Roy* (*roy orbison*), egy eddig azonosítatlan genetikai hátterű mutáns vonal, amelyből hiányoznak a reflektív iridoforok. Ezek olyan kromatofórák (olyan sejtek, amelyek színt termelnek), melyek a fényt a guaninból készült kristályos kemokróm lemezek segítségével verik vissza (Gianluca et al., 2017).

3.2.3. *Tg(βact:YFP)*

A vonalat 4.7 kb ponty β-aktin promóter régiót tartalmazó DNS fragmentumok koinjekciójával hozták létre (Alam et al., 1996), mely a *yfp* génhez kapcsolódik (β-aktin: YFP). A sejtvázfehérje miatt a vonal egyedeinek minden sejtjében sárga színnel expresszál a transzgén (7. ábra), azonban a fiatal fejlődési stádiumú oocytákban (ezek jelennek meg a herében hosszútávú ösztrogén kitettség esetében) az izzás mértéke kb. 10-100x nagyobb (8. ábra), mint más sejtek esetében, így kiválóan alkalmas petesejt markernek.



7. ábra: Adult hím Casper *Tg(βact:YFP)* példány normál és YFP fluoreszcens fényben



8. ábra: Petefészekben fejlődő fiatal és idősebb oocyták YFP fényben – a fiatal oocyták izzása jóval erőteljesebb mint az idősebb fejlődési stádiumban lévőké

3.3. A kísérletekben alkalmazott zebradánió vonalak tartási körülményei

A vizsgálatokban felhasznált zebradánió vonalak a *Chili* (*roy*^{-/-}; *nacre*^{-/-} /*Tg(vtg1:mCherry*; *βact*:YFP) és a *Tg(vtg1:mCherry)* vonalak voltak. Az alkalmazott halakat, külön halnevelő és tartó helységben tartottuk, speciálisan erre a halfajra kifejlesztett Techniplast ZebTEC recirkulációs rendszerben. A rendszer folyamatosan biztosította az optimális vízminőséget a pH-t, a vezetőképességet és a hőmérsékletet. Az állványok aljában található mechanikai és biológiai (kerámia) szűrők és az központi egységben található UV szűrők biztosították a víz tisztaságát és csíra mentességét. A vízparamétereket a nap 24 órájában felügyelte a rendszer. A mért paraméterek ez idő alatt a következők voltak: hőmérséklet: $\sim 25,5^{\circ}\text{C} \pm 1,5^{\circ}\text{C}$; pH: $7,4 \pm 0,2$; vezetőképesség: $520 \pm 50 \mu\text{S}$. A helység ablak nélküli, automatizált fényprogrammal felszerelt, ez biztosította a halak számára a 14 órás világos (természetes fényhatást keltő megvilágítás) és 10 órás sötét periódust. A felnőtt egyedek etetésére napi 2x, Sparos ZEBRAFEED (400-600 μm szemcseátmérőjű) száraz tápot használtunk fel, míg a fejlődő egyedek táplálása banánféreggel (*Helicotylenchus multicinctus*) és kisebb szemcseátmérőjű (<100 μm ; 100-200 μm ; 200-400 μm) Sparos ZEBRAFEED táppal történt. Nagyobb szemű tápra mindig akkor váltottunk, mikor a halak kora és mérete úgy indokolta. Ezen kívül minden hal (10 napos koruktól kezdődően) minden nap, napi egy alkalommal frissen kikelt elő artémiát (*Artemia salina nauplii*) kapott kiegészítésként, ez hozzájárult a halak egészségéhez, a természetes viselkedésmintázatok kialakulásához és segítette az ikra termelődését a szaporítandó anyahalakban. A szaporító állomány 3 literes tankokban, míg a felnőtt kísérleti példányok szeparáltan 1 és 3 literes tankokban voltak elhelyezve.

3.4. A szaporítás és ikranyerés folyamata

A kísérlethez való felkészülést már mindig az azt megelőző napon el kellett kezdeni. Ilyenkor a szaporítandó halakat az ivatást megelőző napon, délután 3 óra magasságában, egy speciális, 1 literes szaporítóedényben (Techniplast Breeding Tanks) (9. ábra) helyeztük el. Az edény belső része lyukas ikraelválasztóval van felszerelve (szülők ikrafalása elkerülése végett), az aljzat kialakítása partközeli szakaszt utánoz. A két nemet választófallal választottuk ketté, jellemzően 3:4 vagy 2:4 (tejes:ikrás) ivararányban. Az edényekbe ezen kívül műnövényeket helyeztünk el, melyek segítettek a halak komfort érzetén és rejtőzködő helyet biztosítottak. Ezen a délutánon már nem kaptak száraztápot az alkalmazott halak. Másnap, az automata világítás felkapcsolása után (reggel 9 órakor), az összes szaporítóedényben lévő rendszervizet friss rendszervízre (a rendszerben recirkuláltatott, tiszta víz) cseréltük és kivettük a válaszfalakat.



9. ábra: Szaporítóedénybe kihelyezett vtg1:mCherry vonal és az ívás folyamata

Ezután az ívás megkezdődött, a megtermékenyülést követően fél óránként gyűjtöttük össze, kisebb lyukátmérőjű hálóval szűrtük le az ikrát, majd embrió médiummal feltöltött petricsészékbe mostuk őket. A folyamatos gyűjtésre azért volt szükség, mert így a begyűjtött ikraszemek később ugyanabban az osztódási stádiumban voltak. Amennyiben nem volt elegendő a leadott ikra, egy kis jéggel segítettük a halakat az íváshoz. Minden folyamat után kálium-permanganátos vízzel fertőtlenítettünk. A halakat minden alkalommal 11:30-kor válogattuk szét nemek szerint és helyeztük vissza a tankokba.

3.5. A Chili vonal egyedfejlődésének vizsgálata

A Chili vonal validálásához a vonal egyedfejlődésének a teljes dokumentációjára volt szükség. Egy szaporítómedencébe 2 ikrás és 3 tejes Chilit tettem, majd másnap az ívásból

összegyűjtöttem az ikrát és 25,5 °C-os inkubátorba tettem. Egészen 5 napos korukig voltak inkubátorban, majd 1 literes tankba helyeztem őket. Ekkortól napi 2x, Sparos ZEBRAFEED (<100 µm) tápot és banánférget (*Helicotylenchus multicinctus*) kaptak takarmányként, majd 10 napos kortól napi 1x frissen kikelt artémiát (*Artemia salina nauplii*) is ettek. 3 hetes korukban tettem át őket 3 literes tankba. Először a 8 sejtes osztódást fotóztam a 0. napon, majd egészen 10 napos korig minden nap készítettem egy sima fénymikroszkópos és két fluoreszcens fénnel (mCherry és YFP) megvilágított képet 1-1 egyedről. 10 nap eltelte után hetente, majd 1 hónapos koruk után havonta fotóztam őket, 3 hónapos korukig, míg ivaréretté nem váltak. A nagyítást mindig a halak méretéhez igazítottam (7,82x-50x-), ~ 15 ms exponálási idővel készítettem a felvételeket. 2 hónapos korukban a két ivart már külön fényképeztem. A vizsgálatok előtt az embriókat majd a lárvákat is 0,02%-os MS-222 (Tricaine-metán-szulfonát) oldatban altattam, majd (1 hónapos korig) 4 %-os metilcellulózba helyeztem őket a fényképezés előtt, amelynek segítségével fixálhattam a pozíciójukat, így könnyítve a felvétel készítését. Ezután a fénymikroszkópos (BF) és a 2 féle filterrel készített képet (YFP, mCherry) egymás mellé illesztettem és az idő függvényében egymás alá szerkesztettem a felvételeket, dokumentálva ezzel a fejlődés ütemét normál tartási körülmények mellett.

3.6. Rövid távú vizsgálatok menete

3.6.1. Rövid távú hatások vizsgálata embriókon

3.6.1.1. Felhasznált anyagok és az embriók kezelése

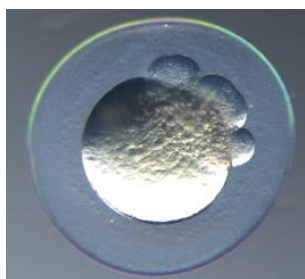
A tesztanyagok rövid távú hatásait *Chili* illetve Tg(*vgt1*:mCherry) vonal egyedein vizsgáltam. A frissen leszűrt ikrákat 25,5 °C-os vagy 27,5 °C-os inkubátorba helyeztem, függően attól, hogy a későbbiekben melyik hőmérsékleti tartományban vizsgáltam az embriófejlődést és a tesztanyagok hatását. Műanyag 50 ml-es falcon csövekbe elkészítettem a hígítási sorokat, melyeket az alábbi táblázatokban foglaltam össze (1. és 2. táblázat). A felhasznált vegyszereket a Merck Kft. gyógyszergyártó vállalat Budapesti telephelyétől rendeltük meg.

Vegyszer neve	Rövidítése	Vizsgált vonalak	Vizsgálati hőmérséklet
17- β -ösztadiol	E2	<i>Chili</i> , <i>vtg1:mCherry</i>	25,5°C és 27,5°C
17- α -etinil-ösztadiol	EE2	<i>Chili</i>	27,5°C

1. táblázat: Az embriók kezelése során felhasznált xenoösztrogének és vizsgálati hőmérsékletük

Vegyszer rövidítése	Törzsoldat koncentrációja	Kezelőoldatok koncentrációja
E2	1 g/l	200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 0,1 μ g/l
EE2	1 mg/l	600; 400; 300; 200; 100; 50 ng/l

2. táblázat: A felhasznált törzsoldatok koncentrációi és a hígítási sorok



10. ábra: 8 sejtés
osztódás
mikroszkópi képe

A termékenyülés után az embriók fejlődését Leica mikroszkóp alatt, folyamatosan nyomon követtem, majd a 8 sejtés állapotban (10. ábra) lévőket 1,5 ml-es pasteur pipetta segítségével külön petricsészébe válogattam. Válogatás után 6 lyukú műanyag platekbe helyeztem a normál fejlődést mutató embriókat, vájatonként 15-öt. Ezután minden elkészített koncentrációból 5 ml oldatot mértem be egy vájatba, egy koncentrációhoz 3 ismétlést készítettem. Minden vizsgálathoz embrió médiumot (NaCl-t, KCl-t, CaCl_2 -t, MgSO_4 -t és NaOH-t tartalmazó RO vízzel hígított és autoklávozott oldat) használtam negatív kontrollként. Ezután az embriókat a vizsgálatokig 25,5 °C-os vagy 27,5 °C-os inkubátorban tartottam.

3.6.1.2. Az embriók mikroszkópos fényképezése

Az embriókat 5 napos korukban kivettem az inkubátorból, majd az oldatot eltávolítottam róluk pasteur pipetta segítségével, majd 0,02%-os MS-222 (Tricaine-metán-szulfonát) oldatban elaltattam őket. Ezután koncentrációként, 15-ösével 4%-os metilcellulózba helyeztem őket a jobb oldalukra fordítva. Ezután fluoreszcens mikroszkóp alatt (Leica M205 FA + DFC7000 T kamera) minden lárváról egy fénymikroszkópos (BF) (exp. idő: 15 ms) és egy fluoreszcens képet (mCherry) készítettem ~1 másodperces exponálási idővel, 50x-es nagyításban.

3.6.1.3. *Fényképek kiértékelése*

A képeket ImageJ programmal elemeztem ki, mely egy Java alapú, képfeldolgozó szoftver. A programot a National Institutes of Health és a Laboratory of Optical and Computational Instrumentation (LOCI) fejlesztették ki (Schneider et al., 2012; Collins, 2007). A képek feldolgozása során saját fejlesztésű makrót használtunk. Minden fluoreszcens képet RGB színskálára bontottam, majd csak a vörös (R-red) tartományt tartottam meg. Ezután a sima fénymikroszkópos képet összehasonlítottam a fluoreszcens kép vörös tartományával, és minden felvételen egy azonos nagyságú és alakú ellipszis (a makró által fixált beállítású), kijelölő területet húztam a májhoz (11. ábra). Ezután a program meghatározta a jel erősségét és a világító terület nagyságát, amelyből integrált denzitás (ID) értéket generált, amely a továbbiakban az értékelések alapját adta.



11. ábra: E2-vel kezelt *Chili* kishal fénymikroszkópos és vörös felbontású fluoreszcens mikroszkópos felvétele, melynél az ellipszist a máj területére húztam az ImageJ programban

Az így kapott ID értékeket Excel táblázatba mentettem, kiértékelésüket GraphPad Prism 9.0.0 (GraphPad Software, San Diego, USA) szoftverrel végeztem. Az adatokat Saphiro-Wilk normalitási tesztnek vetettük alá, mely megállította, hogy az adatok nem felelnek meg a parametrikus módszerek követelményeinek. A szignifikáns különbségeket Kruskal-Wallis analízissel és Šidák-féle utótesztrel végeztük.

3.6.2. A máj fejlődésének vizsgálata

A vizsgálathoz 4:3 (ikrás:tejes) arányban tettem ki a Tg(vtg1:mCherry) és *Chili* vonalat szaporítómedencékbe. Másnap az ikrát begyűjtöttem majd a 25,5 °C-ra és a 27,5 °C-ra beállított inkubátorokba helyeztem őket, mindkét gyűjtésből külön elhelyezett petricsészékben. Az 5.

napon MS-222 segítségével bealtattam az embriókat és 4%-os metilcellulózba helyeztem őket. Ezután fénymikroszkópos felvételeket készítettem róluk (exp. idő: ~15ms), majd a képeken a májakat körbe rajzoltam mindkét vonalon, mindkét tartási hőmérsékleten.

3.6.3. Az mCherry fehérje termelődésének vizsgálata adult hím egyedekben

A vizsgálatot felnőtt *Chili* hímeken végeztem, melyek 1; 10 és 100 ng/l 17- α -etinil-ösztadiol koncentrációjú oldatnak voltak 4 napig kitéve. A kísérlethez koncentrációnként 5 egészséges adult tejes példányt választottam ki, majd az oldatok elkészítése után külön-külön 1 literes tankokba helyeztem őket. A kísérletben részt vevő tankoknál elzártam a befolyást, a kifolyókat pedig parafilmmel letapasztottam. Naponta fénycépeztem őket (4 napig) fénymikroszkópos és mCherry fluoreszcens megvilágítású fényben, a legkisebb nagyításban (7,82x). A felvételek készítése előtt MS-222-vel altattam be a halakat.

3.7. Az EE2 hosszútávú hatásainak vizsgálata adult *Chili* hímeken

Hosszú távú hatásokat a *Chili* vonal adult hím egyedein végeztem melyek 100 ng/l 17- α -etinil-ösztadiol koncentrációjú oldat hatásainak voltak 4 hétig kitéve. A kísérlethez 10 egészséges tejes példányt kiválasztottam és egyesével 1 literes tankokba helyeztem őket. A kísérlet előtt az 1 literes tankok kifolyóját parafilmmel lefóliáztam, így megakadályozva az oldat kiáramlását. 1-10-ig megszámoztam a tankokat, így minden halnak egyedi azonosítója volt (1-5-ig: kontroll halak, sima rendszervízben; 6-10-ig 100 ng/l EE2 oldattal kezelt halak). Ezután minden tankba levegőztetőt helyeztem, így biztosítva a szükséges oxigén szintet. A kísérletben részt vevő halak mindvégig úgy kaptak enni (napi 2x Sparos ZEBRAFEED száraztáp, 1x artémia), mint ahogyan az általános haltartási részben szerepel. Az oldatokat 2 naponta cseréltem minden halon, majd hetente fénycépeztem őket a legkisebb nagyításban (7,82x) fénymikroszkópos és YFP fluoreszcens fényben, mindkét oldalról. A 4 hét alatt nyomon követtem a halak egészségi állapotát, a herék méretének és alakjának változását, illetve a kezelés hatására a herékben megjelenő oocytákat kerestem.

3.7.1. A herék méretében bekövetkező változások nyomon követése

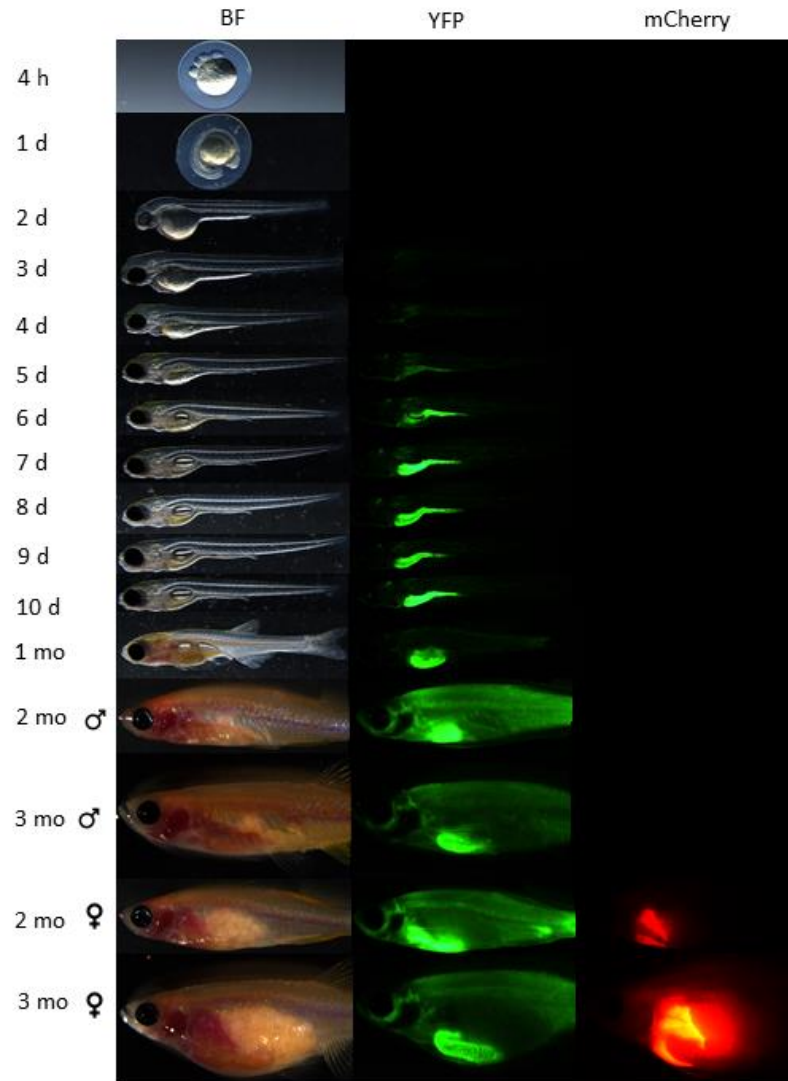
A hétről hétre készült képek összehasonlítását és szerkesztését a GIMP (GNU Image Manipulation Program) 2.10.32.-es szoftverével végeztem. A 0. hét és a 4. hét képein a heréket fehérrel átrajzoltam, majd a képeket réteggként egymásra helyeztem, így nyomon követve a herék méretének és alakjának változását.

3.8. Állatvédelem

A kísérleteket a magyarországi állatvédelmi törvényeknek megfelelően végeztük. A vizsgálatokhoz szükséges kísérleti engedélyekkel rendelkezünk: akut vizsgálatok: PE/EA/350-7/2019; szubkrónikus vizsgálatok: PE/EA/731-7/2019. Az embrióteszteknél minden vizsgálatot befejeztünk az önálló táplálkozásra képes fejlettségi szint elérése előtt (120hpf).

4. Eredmények és értékelésük

4.1. *Chili* vonal egyedfejlődésének dokumentálása



12. ábra: *Chili* vonal egyedfejlődése az idő függvényében, 1. oszlop fénymikroszkópos; 2. oszlop: YFP szűrő alatt készült fluoreszcens felvételek; 3. oszlop: mCherry szűrő alatt készült fluoreszcens felvételek

A fenotípusos elváltozásokat, illetve annak mértékét minden esetben egy referencia megjelenéshez képest határozzuk meg. Ahhoz, hogy az újonnan előállított vonalunk egyedein a kezelések hatásaira megjelenő elváltozásokat korrekten értékelni tudjunk szükségünk volt egy referencia fenotípus sor meghatározására. Ennek érdekében hoztuk létre a *Chili* vonal életciklus térképét, amelyben bright field, illetve fluoreszcens felvételek segítségével dokumentáltuk a halak egyedfejlődésének főbb állomásait (12. ábra).

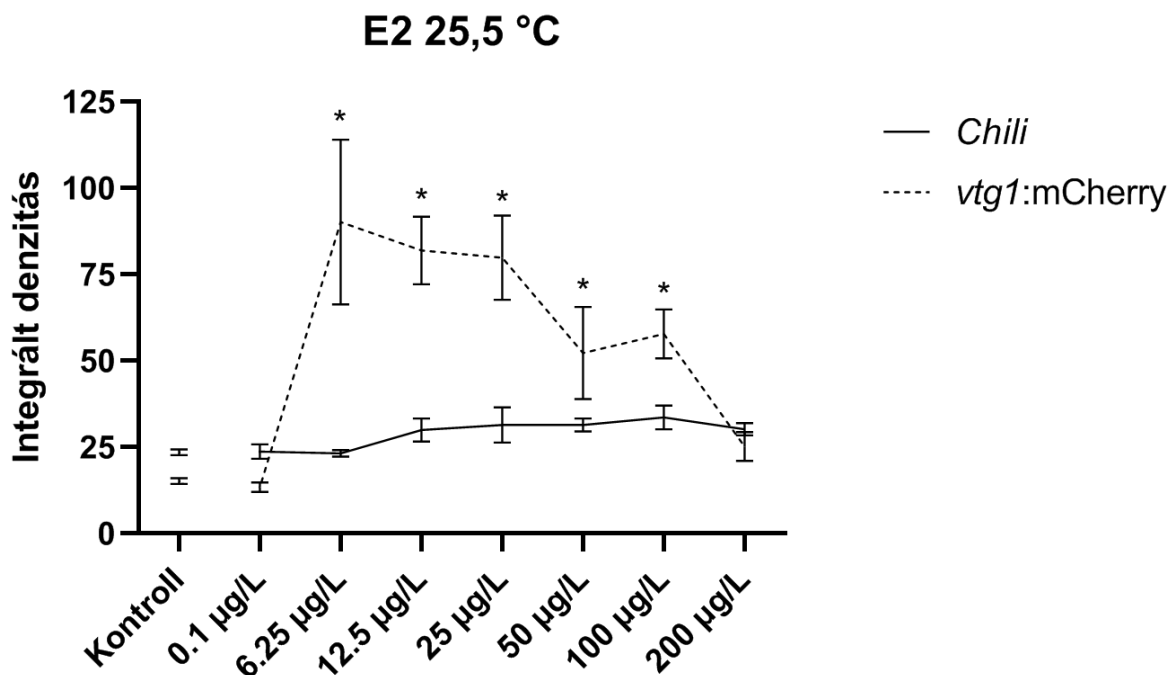
A normál fénymikroszkópos felvételeken jól látszik, hogy a *Chili* vonal egyedei a pigmentálódás kivételével pontosan követik a vad típusú zebradániókra jellemző fejlődési ütemet és megjelenést. A belső szervek, a *Casper* vonalból származó genetikai háttérnek köszönhetően, végig jól megfigyelhetők a teljes egyedfejlődés alatt az állat testén belül *in vivo*. Két hónapos korban már nagyon könnyen megfigyelhetők az ivarszervek is a fiatal egyedekben.

A *β act:YFP* transzgénről termelődő fluoreszcens fehérje már anyailag is megjelenik a fejlődő utódokban, egy alap sárgás izzás már közvetlenül a termékenyülés után is megfigyelhető a fejlődő embriókban. A fluoreszcens jel a fejlődés előrehaladtával egyre inkább erősödik az egyedekben, ahol elsősorban a vázizomzatban, illetve az emésztőrendszerben lehet megfigyelni jelentős aktivitását. Két hónapos kor körül a nőtények fejlődésben lévő petefészkében a fiatal fejlődésű oocytákat tartalmazó területeken is jelentős expresszió figyelhető meg. A nagy mennyiségű érett petesejtet tartalmazó petefészekben azonban a fluoreszcens fehérje jelenléte, a nagy mennyiségű szikfelhalmozódás miatt, már nehezen detektálható. A hímekben sem a fejlődő, sem az érett herékben nem figyelhető meg számottevő fluoreszcens jelbeli eltérés a vázizomzatban megfigyelhetőhöz képest.

Az mCherry fehérje megjelenése, a *Tg(vtg1:mCherry)* vonalhoz hasonlóan, csak a nőtényekben detektálható az ivari érés megkezdése utáni időszakban a máj területén, körülbelül két hónapos kortól. Az egyedfejlődés korai szakaszában, illetve a hímekben a vörös világító fehérje nem fejeződik ki normál körülmények között.

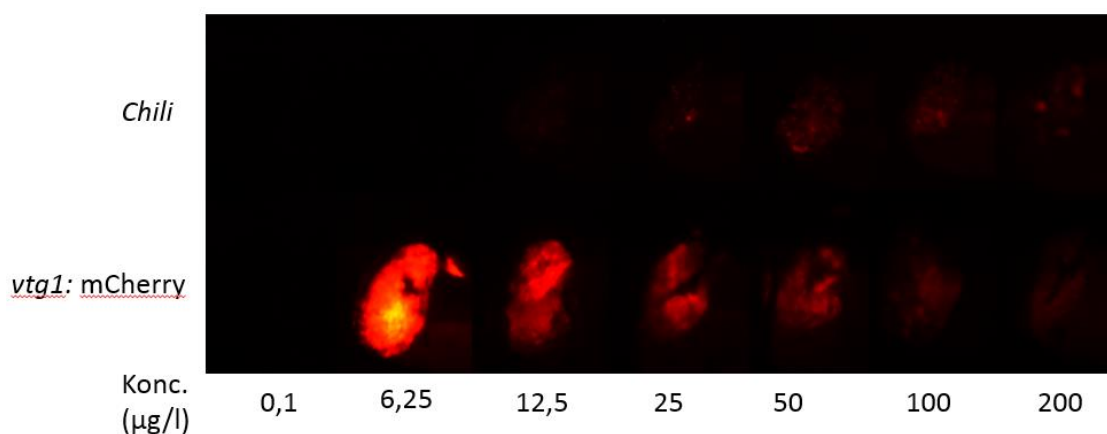
4.2. Rövid távú kezelések hatásainak vizsgálata

4.2.1. Rövid távú vizsgálatok eredményei embriókon



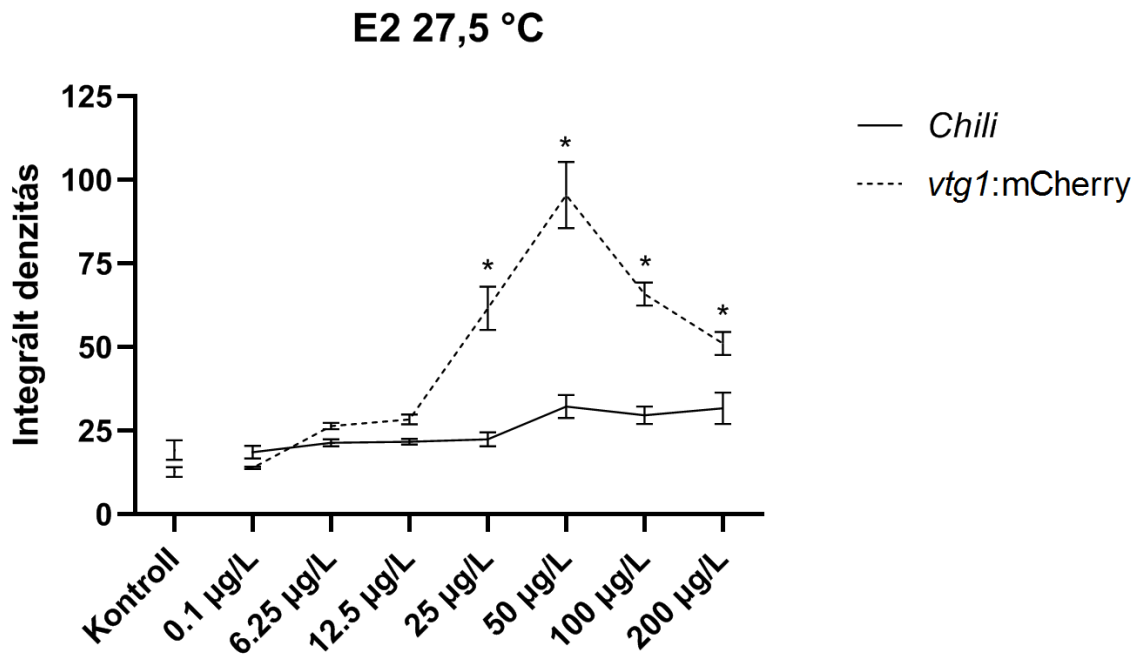
13. ábra: 25,5 °C hőmérsékleten, E2-vel kezelt Chili és vtg1:mCherry embriók integrált denzitásának összehasonlító grafikonja. A szignifikáns eltérések megjelölése a kontrolltól (*), a 6,25 ($p < 0,0001$); 12,5 ($p < 0,0001$); 25 ($p < 0,0001$); 50 ($p < 0,05$); 100 ($p < 0,05$) µg/l értékeknél

Mivel a vonal használata a toxikológia és fejlődésbiológia területén is várható, amelyek a vizsgálatok során eltérő hőmérsékleten történő tartást írnak elő, így a vizsgálatokat 25,5 °C-on, illetve 27,5 °C-on is elvégeztük, az esetleges eredménybeli eltérések feltárása érdekében. A vizsgálatok során arra is szerettünk volna választ kapni, hogy van-e érzékenységbeli eltérés a Chili vonal embrióinak, illetve a keresztezési partnerként használt, eredeti vtg transzgenikus vonal embriói között az ösztrogénhatású anyagokra, így a vizsgálatokat mindkét vonal embrióin elvégeztük. A kísérletben 3 ösztrogénhatású anyag (E2, EE2) hatását vizsgáltam a megtermékenyítéstől kezdve 5 napon keresztül. Elsőként a Chili és az vtg1:mCherry vonalak összehasonlítását végeztem el E2 hatására 25,5 °C-on, amely a toxikológiai vizsgálatokhoz az OECD által ajánlott hőmérséklet, az 5. napon (13. ábra).

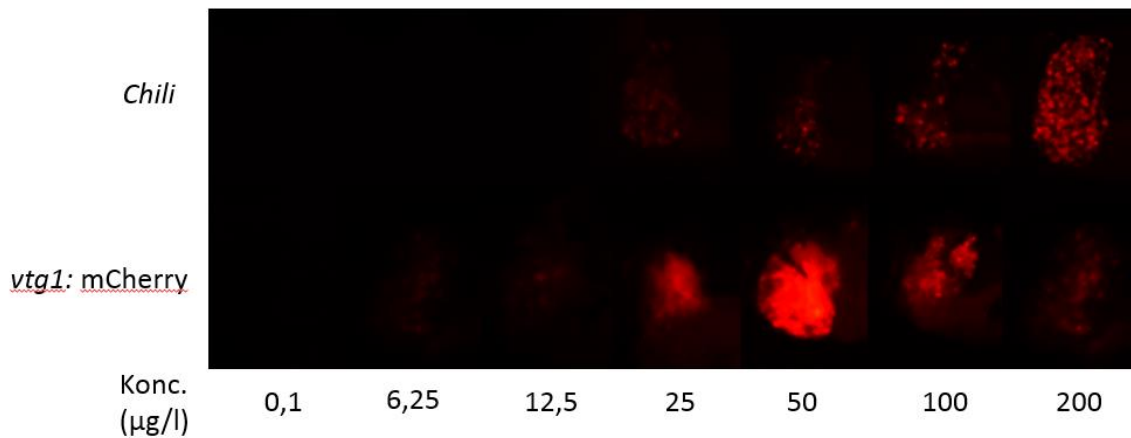


14. ábra: A fluoreszcens jel változása E2 kezelés hatására, különböző koncentrációkon a *Chili* és *vtg1:mCherry* lárvák májában 25,5 °C-on történő tartás mellett (fluoreszcens felvételek)

A kezeletlen kontrollnál, a legkisebb (0,1 µg/l) és a legnagyobb (200 µg/l) kezelés esetében nem volt kimutatható szignifikáns különbség a két vonal integrált denzitása között. A *vtg1:mCherry* embriók ID értéke a 6,25 µg/l-nél elérte el a plató fázist kezdetét, majd egy folyamatos visszaesés volt megfigyelhető az ID értékekben, feltehetőleg az anyag toxikus hatása miatt. A *Chili* vonal integrált denzitás értékei mindvégig alulmaradtak a *vtg1:mCherry* vonal értékeihez képest. A két vonal májában megjelenő reprezentatív fluoreszcens felvételeket a 14. ábra tartalmazza.



15. ábra: 27,5 °C hőmérsékleten, E2-vel kezelt Chili és vtg1:mCherry embriók integrált denzitásának összehasonlító grafikonja, szignifikáns különbségekkel (*) megjelölve: 25 ($p < 0,0001$); 50 ($p < 0,0001$); 100 ($p < 0,0001$); 200 ($p < 0,0001$) µg/l-nél

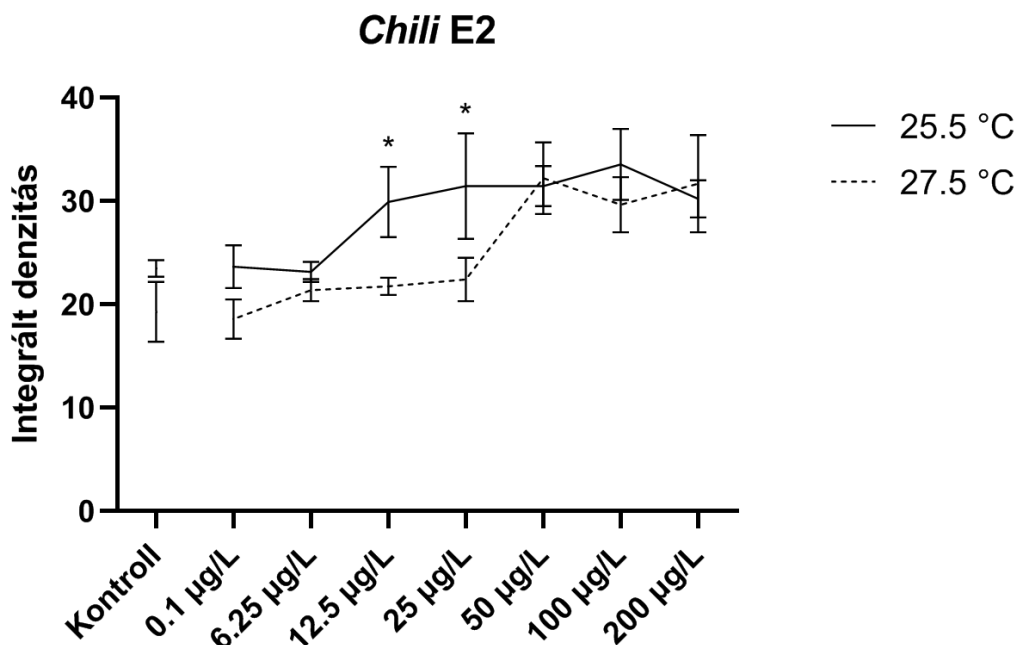


16. ábra: A fluoreszcens jel erősödése Chili és vtg1:mCherry lárva májában nagyobb töménység felé haladva mCherry fluoreszcens megvilágítás alatt

A 27,5 °C, amely a fejlődésbiológiai vizsgálatok elvégzéséhez javasolt hőmérséklet, a kísérlet második felében ezért ezen a hőmérsékleten is elvégeztük a kísérleteinket.

A vizsgált halak integrált denzitás értékeinek a görbéje már más lefutást mutatott, mint alacsonyabb hőmérsékleten (15. ábra): a kezeletlen kontrollnál, és a kisebb koncentrációknál (0,1; 6,25; 12,5 µg/l) a két vonal integrált denzitása között nem volt kimutatható szignifikáns különbség. A vtg1:mCherry embriók ID értéke az 50 µg/l –nél elérte a plató fázist, majd egy

folyamatos visszaesés volt tapasztalható. A *Chili* vonal ID (integrált denzitás) értékei ebben a vizsgálatban is alul maradtak a *vtg1:mCherry* vonal értékeihez képest. ebben csak a 0,1 µg/l – es koncentráció jelentett kivételt. A májban megjelenő reprezentatív fluoreszcens felvételeket a 16. ábrán szemléltettem.

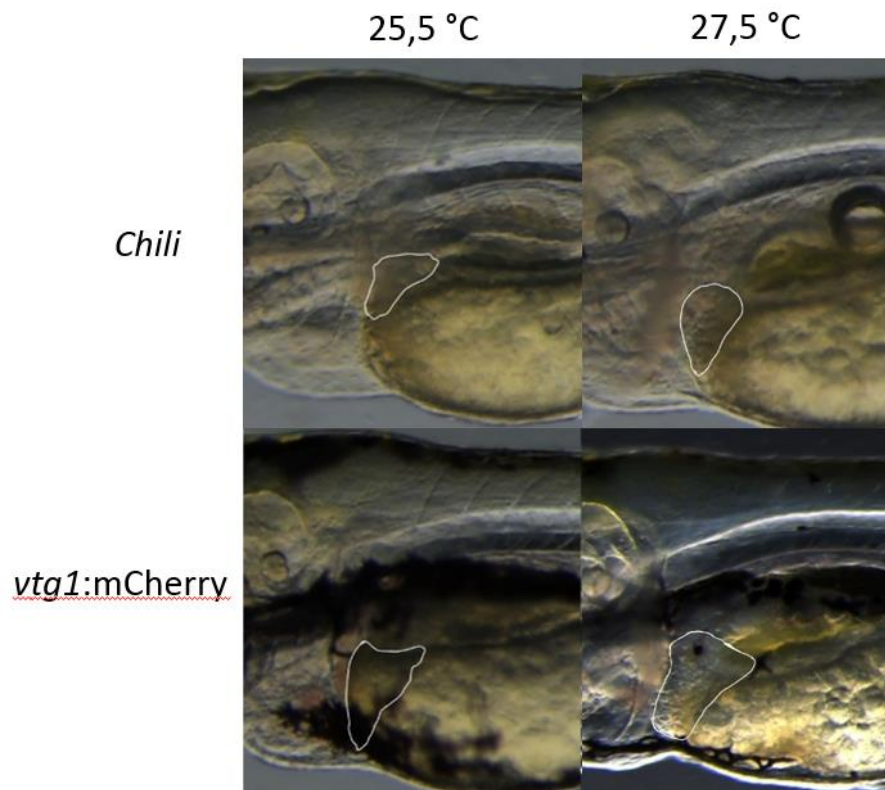


17. ábra: A két hőmérsékleten kezelt *Chili* embriók májának integrált denzitás értékei, szignifikáns különbségekkel (*) megjelölve: 12,5 ($p<0,05$) és 25 ($p<0,05$) µg/l-nél

A *Chili* embrióknál a két tartási hőmérsékleten kapott ID eredményeket összehasonlító ábra (17. ábra) alapján elmondható, hogy a 25,5 °C hőmérsékleten kezelt embriók májának integrált denzitás értékei az azonos kezelési dózisokat összevetve magasabb értékeket mutattak. A két értékörbe szinte végig párhuzamosan követi egymást, mindössze a 12,5 µg/l-es ($p<0,05$) és a 25 µg/l-es ($p<0,05$) dózisokkal történt kezelések esetében volt megfigyelhető szignifikáns különbség.

4.2.2. A *Chili* és a *vtg1:mCherry* embriók májfejlődésének összehasonlítása

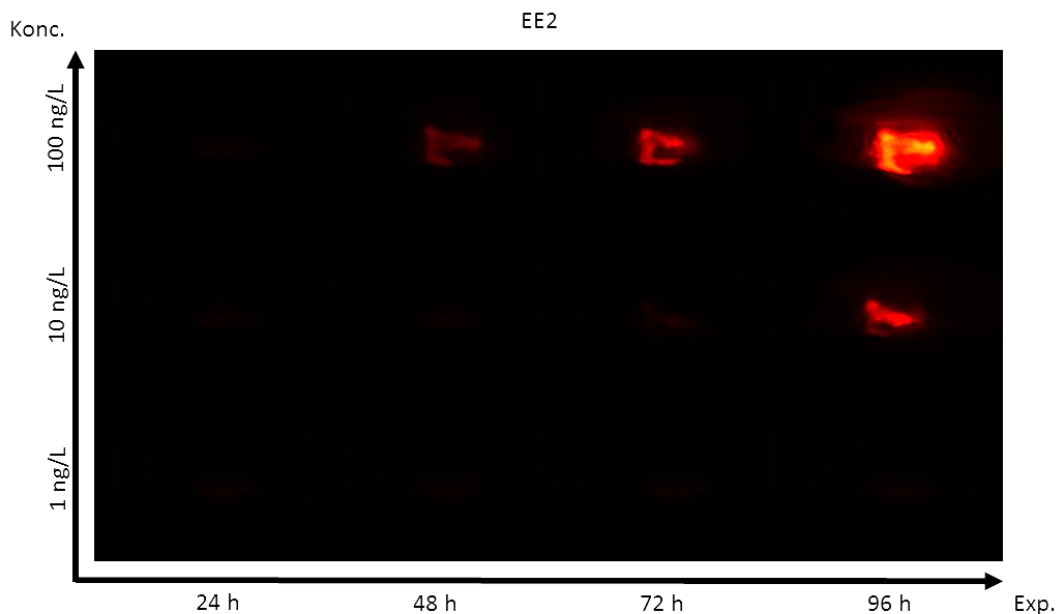
Szerettünk volna arra is fényt deríteni, hogy mi állhat a két vonal (*Chili* és *vtg1:mCherry*) eltérő érzékenysége mögött. Ezért kezeletlen embriókban megvizsgáltuk a máj fejlődésbeli eltérését, mivel a máj mérete és fejlettsége egyértelműen befolyásolja a fluoreszcens jel intenzitását és a világító terület nagyságát.



18. ábra: A különböző hőmérsékleten tartott Chili és a *vtg1:mCherry* májméretének összehasonlító ábrája

A két különböző hőmérsékleten tartott embrióknál és a két vonal egyedei közt is jelentős eltérést láthattunk (18. ábra). Mindkét vonal esetében a 27,5 °C-on tartott embrióknál a máj nagyobb, fejlettebb volt az ugyanabban a fejlődési állapotban lévő egyedeknél, mint alacsonyabb tartási hőmérsékleten. Az ábrán jól látszik, hogy a *vtg1:mCherry* embriók mája lényegesen nagyobb és fejlettebb volt, mint az ugyanolyan korú és ugyanolyan tartási hőmérsékleten fejlődő *Chili* egyedeknél. Ez a fejlődésbeli különbség magyarázatul szolgálhat az ID értékeknél tapasztalt eltérésekre.

4.2.3. Az mCherry fehérje termelődésének változása EE2 kezelt adult hím egyedekben



19. ábra: Fluoreszcens jel kifejeződése felnőtt hím Chili halak májában EE2 kezelés hatására, a koncentráció és az idő függvényében

Az embriók érzékenység vizsgálata mellett, a felnőtt hím egyedek ösztrogénérzékenységét is fel szeretnénk volna deríteni. Ennek érdekében akut vizsgálatot végeztünk hím *Chili* halakon, melyeket 3 különböző EE2 koncentrációnak tettünk ki. A 19. ábrán jól látható, hogy a hímek májában a különböző koncentrációjú (1; 10 és 100 ng/l) 17- α -etinil-ösztradiol hatás következtében mikor következett be az expresszió. Míg 100 ng/l-nél már 48 óra elteltével, addig a 10 ng/l-es töménységnél csak 72 óra elteltével jelent meg a fluoreszcens jel a májban. Az 1 ng/l-es koncentráció esetében nem figyeltem meg változást 96 óra elteltével sem.

4.3. Hosszú távú hatások vizsgálata *Chili* hímeken

4.3.1. A herékben bekövetkező változások nyomon követése

Mivel az irodalmi adatokból ismert, hogy a here minőségére is hatással vannak a xenoösztrogén anyagok, szeretnénk volna megnézni, hogy *in vivo* körülmények között nyomon követhetőek-e *in vivo* a szervben bekövetkező változások. Ennek érdekében 4 hetes (krónikus) etinil-ösztradiolnak tettük ki a hím *Chili* egyedeket, mely jól észlelhető elváltozásokat generált a kezelt halakban 100 ng/l-es koncentráción.



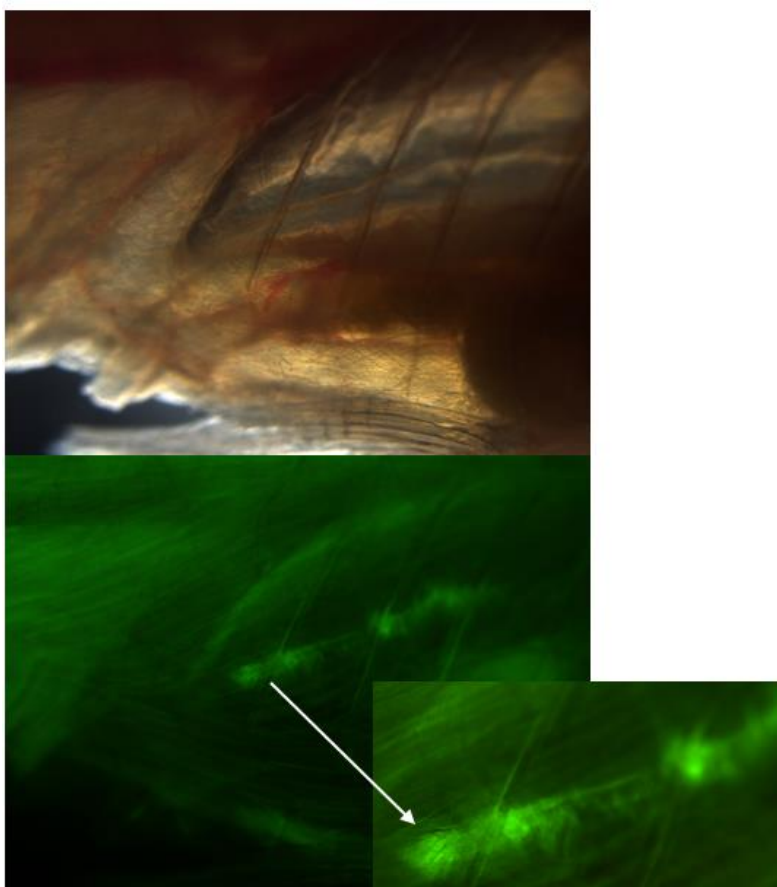
20. ábra: 100 ng/l EE2-vel kezelt felnőtt hím *Chili* a 4 hetes expozíció előtt (balra) és után (jobbra)

A halak a kezelés hatására látványosan megváltoztak: a pikkelyek elállását (pikkelyborzolás), a testtömeg csökkenését és a here alakjának és méretének elváltozását figyeltük meg (20. ábra), utóbbinál a zsugorodás mértékét a herének a körberajzolásával szemléltettem. Az állatok színében is jelentős eltérést mutatkozott, a kezelt halak jóval fakóbbak voltak a 4. hét végére, a kopoltyú vérbőségének mellett a máj vérbőség növekedése is megfigyelhető volt. A kezelt halak aktivitásukban is alul maradtak kontroll társaiknál.

4.3.2. Az ovotestis megjelenésének vizsgálata

Mivel a *Chili* vonal egyik fő felhasználási irányának az ovotestis kialakulási folyamatának vizsgálatát és *in vivo* megfigyelését szánjuk, bizonyítani szeretnénk volna, hogy a vonal valóban alkalmas-e erre, az eredeti elképzelésünknek megfelelően. Ezért szubkrónikus (4 hetes) vizsgálatot végeztünk, melynél 5 adult tejes egyedett tettünk ki 100 ng/l EE2 koncentrációnak, 5 kontroll egyeddel szemben. Az egyedekről minden héten fénymikroszkópos (BF) és fluoreszcens (YFP) felvételt készítettem, melyek alapján ellenőriztem a herék állapotát. A petesejtek megjelenésére a herékben csak a 4. héten találtunk egyértelmű

bizonyítékot. Az ovotestist az 5 kezelt halból 2 egyed esetében sikerült fenotípusosan megfigyelnünk. Az ovotestisról készült felvételek a 21. ábrán láthatóak.



21. ábra: Ovotestis megjelenése a hereszövetben (alul: YFP fluoreszcens felvétel a heréről, benne oocyták; fent: ugyanazon testrész fénymikroszkópos felvétele)

5. Következtetések és javaslatok

- Általánosságban elmondható, hogy a *Chili vonal* egyaránt alkalmas az ösztrogénhatású anyagok rövid- és hosszútávú hatások vizsgálatára. A megfigyelt elváltozások *in vivo* nyomon követhetők akár ugyanazon az állaton belül is.
- A fejlődésbiológusok (27,5 °C) és a toxikológusok (25,5 °C) által használt hőmérsékleten tartott és kezelt egyedek között nem volt jelentős különbség a *Chili vonal* esetében az embriók ID értékei között. A jelek erőssége azonban a Tg(vtg1:mCherry) vonalhoz képest jelentősen kisebb volt.
- Az akut embrió tesztekben végzett vizsgálatoknál a *Chili* inkább igen-nem választ adott, ezért az ilyen jellegű vizsgálatokra inkább a Tg(vtg1:mCherry) vonal az alkalmasabb, melynél a dózis mértékétől függött a jel kifejeződése és erőssége.
- Az mCherry fehérje termelődése az endogén vitellogenin termelődéssel párhuzamosan és megegyező intenzitással zajlik a zebradániók májában (Bakos et al., 2019.), amelyre a szerv érettsége és épsége is nagymértékben hat, mely befolyásolja az integrált denzitás értékét is. A *Chili* egyedek esetében a máj fejlettsége alulmaradt a Tg(vtg1:mCherry) vonal ugyanazon körülmények között tartott és kezelt egyedeihez képest, ami magyarázatul szolgál ID értékeknél tapasztalt eltéréséknél a két vonal között.
- A hosszútávú vizsgálatoknál sikerült megfigyelni az ovotestis megjelenését, valamint jól nyomon követhető voltak a belső szervek és szövetek elváltozása a kezelés hatására a *Chili* hímeken. A vonal lehetőséget nyújt arra, hogy folyamatukban is nyomon követhetők legyenek az elváltozások. Ez jó lehetőséget biztosít az egyes elváltozások kritikus szakaszainak meghatározásához, a mintavételezések pontos időzítéséhez, illetve a molekuláris hátterük pontos feltárásához.
- A vonal használata hozzájárul a 3R (Replacement, Reduction, Refinement) stratégiához. A *Chili* vonal multikolor kialakítású biomarker vonal amely a *Casper* keresztezési partner tulajdonságait is hordozza (transzparens test) így egyrészt kevesebb szülő egyedre kell felhasználni az állomány fenntartásához, másrészt a kísérletben felhasznált halak mennyisége is jelentősen csökkenthető a használatukkal.
- Mivel a β -actin:YFP transzgenikus halak minden sejtjében expresszál a transzgén, egy alapvető „háttérzajt” jelentkezik az oocyták vizsgálatánál, amellyel számolni kell a vizsgálatok értékelésénél. Annak ellenére, hogy a β -actin:YFP transzgén betöltötte a

neki szánt szerepet a *Chili* vonalon belül, egy másik kifejezetten oocyta specifikus transzgén használata megfontolandó lehet egy újabb „*Chili* verzió” kialakításánál.

- A vonal az eddigi eredményeink alapján alkalmas egyedi hatóanyagok, hatóanyag kombinációk és környezeti minták rövid és hosszútávú vizsgálatára, illetve felhasználható lehet az ivarszervek kialakulásával, működésével kapcsolatos fejlődésbiológiai vizsgálatoknak is, melynek eredményei akár közvetlenül is felhasználhatóak lehetnek akár a tógazdasági, vagy egyéb akvakultúrás haltenyésztés területén is.

6. Összefoglalás

Az ösztrogénhatású anyagok a természetes közegek közül legnagyobb mértékben a felszíni vizeinket szennyezik. A halak, amelyek az egyetlen olyan gerinces csoport képviselői, amelyek a teljes életciklusukat a vízben töltik, fokozottan ki vannak téve a hatásaiknak. A xenoösztrogének halakra gyakorolt rövidtávú hatásai laborkörülmények között jól modellezhetőek és vizsgálhatóak akár *in vivo* körülmények között is, a hosszútávú vizsgálatoknál a szervi/szöveti elváltozások modellezése azonban csak korlátozottan lehetséges, illetve ez esetben az *in vivo* vizsgálati lehetőségek lényegében hiányoznak, annak ellenére, hogy nagy igény lenne rájuk.

A zebradánió (*Danio rerio*), mint kísérleti modell nyújtotta előnyöket kihasználva a tanszékünk egy olyan biomarker zebradánió vonalat hozott létre, amely segítségével egyszerre követhetőek nyomon az ösztrogénhatású anyagok okozta rövidtávú (vitellogenin termelés változása), valamint hosszútávú (ovotestis kialakulása) élettani folyamatok az állat elpusztítása nélkül. Dolgozatom középpontjában ez a dupla recesszív mutációt tartalmazó multikolor biomarker transzgenikus zebradánió vonal, a *Chili* (*roy*^{-/-}; *nacre*^{-/-}/Tg(*vtg1*:mCherry;*βact*:YFP) vizsgálata állt, melynek a toxikológiai és fejlődésbiológiai célokra történő felhasználhatóságát több szempont szerint is jellemeztem:

- A *Chili* vonal egyedfejlődését nyomonkövetve készítettem egy életciklus atlaszt a termékenyüléstől az ivaréérésig, amely referenciaként használható a vonal egyedein történő vizsgálatok okozta fenotípusos elváltozások, illetve azok mértékének a meghatározásához mindkét ivar esetében.
- Rövid távú EDC kezelések segítségével elvégeztem a *Chili* és a kialakításánál keresztezési partnerként használt Tg(*vtg1*:mCherry) transzgenikus vonalak embrióinak összehasonlítását az ösztrogénérzékenységük szempontjából. Az eredmények alapján elmondható, hogy bár a *Chili* vonal alkalmas az akut embrió vizsgálatokra, a Tg(*vtg1*:mCherry) vonal érzékenysége minden esetben felülmúlja azt.
- Tanulmányoztam továbbá a vitellogenin termelés indukcióját jelző mCherry fluoreszcens jel kifejeződését adult *Chili* hím egyedek májában, akut EE2 kezelések hatására. A vizsgálatok során a környezeti koncentrációk körüli dózisoknál a fluoreszcens jel aktiválódása már 48-72 óra alatt *in vivo* is megfigyelhető volt a kísérlet kezdete után.

- Az adult hímeken EE2-vel folytatott hosszútávú kezelések során sikerült megfigyelni fluoreszcens mikroszkóp segítségével a vegyület által okozott ovotestis kialakulását az állatok feláldozása nélkül is.

Összességében elmondható, hogy a *Chili* vonal beváltotta a hozzá fűzött reményeket és kiválóan alkalmas az ösztrogénhatású vegyületek rövid és hosszútávú hatásainak *in vivo* nyomonkövetéséhez. A vonal a fejlődésbiológiai és a toxikológiai vizsgálatok egy új, nagy jövő előtt álló modellje lehet a továbbiakban.

7. Köszönetnyilvánítás

Elsősorban szeretném megköszönni konzulensemnek, Dr. Csenki-Bakos Zsolt Imrének, aki mindvégig segítséget nyújtott, szakértelmével és hasznos tanácsaival hozzájárult a dolgozatom elkészüléséhez.

Másodsorban szeretném megköszönni a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem Környezettoxikológia Tanszék dolgozóinak: Bock Illésnek, Lajos Annamária Lillának, Virág Juditnak és Szabó-Surman Erikának a lelkiismeretes munkájukat és támogatásukat, mellyel hozzájárultak a dolgozat elkészüléséhez.

Végül szeretném megköszönni a barátaimnak, páromnak és a családomnak a támogatást.

A Tg(*βact*:YFP) zebradánió vonalat a Karlsruhe Institute of Technology (GER), a *Casper* mutáns zebradánió vonalat Leonard I. Zon és Richard Mark White (Children's Hospital Boston, USA) bocsátotta a rendelkezésünkre. A munkát az alábbi pályázatok támogatták: NVKP_16- 1- 2016- 0023, 2020- 1.1.2- PIACI- KFI- 2021- 00239, TKP2021- NVA- 22

A MUNKA A KULTURÁLIS ÉS INNOVÁCIÓS MINISZTERIUM ÚNKP-22-2 ÉS ÚNKP-22-5-MATE/8 KÓDSZÁMÚ ÚJ NEMZETI KIVÁLÓSÁG PROGRAMJÁNAK A NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI ÉS INNOVÁCIÓS ALAPBÓL FINANSZÍROZOTT SZAKMAI TÁMOGATÁSÁVAL KÉSZÜLT.



8. Irodalomjegyzék

9.1. Felhasznált szakirodalom

- Adlercreutz, Hh., Mmazar, Ww. 1997. Phyto-oestrogens and Western diseases. *Annals of Medicine*. 29. 95-120.
- Alam, M.S., Lavender, F.L., Iyengar, A., Rahman, M.A., Ayad, H.H., Lathe, R., Morley, S.D. and Maclean, N. (1996). Comparison of the activity of carp and rat beta-actin gene regulatory sequences in tilapia and rainbow trout embryos. *Mol Reprod Dev* 45: 117-122.
- Almeida De, M. D., Pereira, T. S. B., Batlouni, S. R., Boscolo, C. N. P., & de Almeida, E. A. (2018). Estrogenic and anti-androgenic effects of the herbicide tebuthiuron in male Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquatic Toxicology*, 194, 86–93.
- Bakos, K., Kovacs, R., Balogh, E., Sipos, D. K., Reining, M., Gyomrei-Neuberger, O., ... & Csenki, Z. (2019). Estrogen sensitive liver transgenic zebrafish (Danio rerio) line (Tg (vtg1: mCherry)) suitable for the direct detection of estrogenicity in environmental samples. *Aquatic Toxicology*, 208, 157-167.
- Burki R, Vermeirssen ELM, Koerner O, Joris C, Burkhardt-Holm P, et al. (2006) Assessment of estrogenic exposure in Brown trout (Salmo trutta) in a swiss midland river: integrated analysis of passive samplers, wild and caged fish, and vitellogenin mRNA and protein. *Environ Toxicol Chem* 25: 2077.
- Campbell, P. M., & Hutchinson, T. H. (1998). Wildlife and endocrine disrupters: Requirements for hazard identification. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17(1), 127–135
- Chang, H.-S., Choo, K.-H., Lee, B., & Choi, S.-J. (2009). The methods of identification, analysis, and removal of endocrine disrupting compounds (EDCs) in water. *Journal of Hazardous Materials*, 172(1), 1–12.
- Chieffi, P., D'Amato, L. C., Guarino, F., Salvatore, G., & Angelini, F. (2002). 17 β -estradiol induces spermatogonial proliferation through mitogen-activated protein kinase (extracellular signal-regulated kinase 1/2) activity in the lizard (Podarcis s. sicula). *Molecular Reproduction and Development*, 61(2), 218–225 p
- Collins, T. J. (2007). ImageJ for microscopy. *BioTechniques*, 43(1S), S25–S30
- Csenki, Z., Horváth, Á., Bock, I., Garai, E., Kerekes, F., Vársárhelyi, E., ... & Bakos, K. (2020). Using Tg (Vtg1: mcherry) Zebrafish Embryos to Test the Estrogenic Effects of Endocrine Disrupting Compounds. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (162), e60462
- Csenki-Bakos K. (2014.): Ösztrogén hatást kimutató biomarker zebradánio vonal létrehozása. Doktori (PhD) értekezés, SZIE, Gödöllő, 158p
- deFur PL. (2004): Use and Role of Invertebrate Models in Endocrine Disruptor Research and Testing. *ILAR J*, 45 (4): 484-493.
- Depiereux, S., Liagre, M., Danis, L., De Meulder, B., Depiereux, E., Segner, H., & Kestemont, P. (2014). Intersex Occurrence in Rainbow Trout (Oncorhynchus mykiss) Male Fry Chronically Exposed to Ethynylestradiol. *PLoS ONE*, 9(7), e98531.

- Fenske, M., Maack, G., Schäfers, C., & Segner, H. (2005). An environmentally relevant concentration of estrogen induces arrest of male gonad development in zebrafish, *Danio rerio*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24(5)
- Gong, J., Duan, D., Yang, Y., Ran, Y., & Chen, D. (2016). Seasonal variation and partitioning of endocrine disrupting chemicals in waters and sediments of the Pearl River system, South China. *Environmental Pollution*, 219, 735–741.
- Grier HJ, Uribe MC, Parenti LR (2007) Germinal epithelium, folliculogenesis, and postovulatory follicles in ovaries of Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) (*Teleostei*, *Protacanthopterygii*, *Salmoniformes*). *J Morphol* 310: 293–310.
- Gubó Eduard, Szakál Pál, Plutzer Judit, (2019.): Ösztrogének és ösztrogénhatású anyagok a növénytermesztésben Széchenyi István Egyetem, Mezőgazdaság- és Élelmiszertudományi Kar, Mosonmagyaróvár, 17 p.
- Hahn J. (2021): Szóbeli közlés. Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet, Környezetbiztonsági Tanszék
- Jobling S., Casey D., Rogers-Gray T., Oehlmann J., Schulte-Oehlmann U., Pawlowski S., Baunbeck T., Turner AP., Tyler CR. (2004): Comparative responses of molluscs and fish to environmental estrogens and an estrogenic effluent. *Aquat Toxicol*, 66 (2): 207-22.
- Kerdivel G., Habauzit D., Pakdel F. (2013): Assessment and molecular actions of endocrinedisrupting chemicals that interfere with estrogen receptor pathways. *Int J Endocrinol*, 2013
- Kim, S. D., Cho, J., Kim, I. S., Vanderford, B. J., & Snyder, S. A. (2007). Occurrence and removal of pharmaceuticals and endocrine disruptors in South Korean surface, drinking, and waste waters. *Water Research*, 41(5), 1013–1021.
- Kime, D. E. (1995). The effects of pollution on reproduction in fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 5(1), 52–95
- Liu, J., Wang, R., Huang, B., Lin, C., Wang, Y., & Pan, X. (2011). Distribution and bioaccumulation of steroidal and phenolic endocrine disrupting chemicals in wild fish species from Dianchi Lake, China. *Environmental Pollution*, 159(10), 2815–2822.
- Maack G, Segner H. 2003. Morphological development of the gonads in the zebrafish. *J Fish Biol* 62:895–906.
- Maack, G., & Segner, H. (2004). Life-stage-dependent sensitivity of zebrafish (*Danio rerio*) to estrogen exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 139(1-3), 47–55.
- Manach C, Donovan JL. (2004): Pharmacokinetics and metabolism of dietary flavonoids in humans. *Free Radic Res*, 38:771-785
- Mizell M, Romig ES. 1997. The aquatic vertebrate embryo as a sentinel for toxins: zebrafish embryo dechoriation and perivitelline space microinjection. *Int J Dev Biol* 41:411–423.
- Mylonas CC, Fostier A, Zanuy S (2010): Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. *Gen Comp Endocrinol* 165: 516–534

- Pakhomov, A. A., Martinov V. I. (2008): GFP Family: Structural Insights into Spectral Tuning. *Chemistry & Biology* 15, 755-764.
- Ryan KJ (August 1982). "Biochemistry of aromatase: significance to female reproductive physiology". *Cancer Research*. 42 (8 Suppl): 3342s–3344s
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW (2012). "NIH Image to ImageJ: 25 év képelemzés" . *Nat Methods* . 9 (7): 671–675. doi : 10.1038/nmeth.2089 . PMC 5554542 . PMID 22930834 .
- Scholz, S., & Klüver, N. (2009). Effects of Endocrine Disrupters on Sexual, Gonadal Development in Fish. *Sexual Development*, 3(2-3), 136–151.
- Seki, M., Yokota, H., Matsubara, H., Tsuruda, Y., Maeda, M., Tadokoro, H., & Kobayashi, K. (2002). Effect of ethinylestradiol on the reproduction and induction of vitellogenin and testis-ova in medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21(8), 1692–1698.
- Soto A, Sonnenschein C, Chung KL, Fernandez MF, Olea N, Serrano FO. (1995): The ESCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environment pollutants. *Environ Health Perspect*, 103:113-122.
- Ternes, T. ., Stumpf, M., Mueller, J., Haberer, K., Wilken, R.-D., & Servos, M. (1999). Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants — I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. *Science of The Total Environment*, 225(1-2), 81–90.
- Verderame, M., Scudiero, R., & Limatola, E. (2017). Exploring the Role of Estrogens in Lizard Spermatogenesis through the Study of Clomiphene and FSH Effects. *International Journal of Endocrinology*, 2017, 1–9.
- Wright-Walters, M., Volz, C., 2009. Municipal wastewater concentrations of pharmaceutical and xeno-estrogens: wildlife and human health implications. *Proceedings of the 2007 National Conference on Environmental Science and Technology*. pp. 103–113.
- Yang L., Ho NY., Alshut R., Legradi J., Weiss C., Reischl M., Mikut R., Liebel U., Müller F., Sträle U. (2009): Zebrafish embryos as models for embryotoxic and teratological effects of chemicals. *Rep Tox*, 28: 245-253
- Zákányiné M. R., Muránszky G. (2013.): Élőlények hormonrendszerét befolyásoló anyagok detektálási és vizekből történő eltávolítási nehézségei, *Anyagmérnöki Tudományok*, 38/1. pp.349-358.

9.2. Internetes hivatkozások

- http 1 Ecological status of surface waters in Europe (<https://www.eea.europa.eu/ims/ecological-status-of-surface-waters>)
- http 2 National Library of Medicine, PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5757#section=Structures>)
- http 3 National Library of Medicine, PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5991>)