

A biomolekuláktól a viselkedésig: vízi modell állatok komplex válasza progesztogén hatóanyagok hosszútávú terhelése során

Doktori (PhD) értekezés

DOI:10.18136/PE.2021.798



Svigruha Réka

Témavezetők:

Prof. Dr. Padisák Judit, Pannon Egyetem, Mérnöki Kar,
Természettudományi Központ, Limnológia Kutatócsoport, Veszprém

Dr. Pirger Zsolt, Balatoni Limnológiai Kutatóintézet, Ökofiziológiai és
Környezettoxikológiai Kutatócsoport, Adaptációs Neuroetológiai
Kutatócsoport, Tihany

Pannon Egyetem

Kémiai és Környezettudományi Doktori Iskola

Veszprém, 2021

**A biomolekuláktól a viselkedésig: vízi modell állatok komplex válaszai
progesztogén hatóanyagok hosszútávú terhelése során**

Írta:

Svigruha Réka

Készült a Pannon Egyetem Kémiai és Környezettudományi Doktori Iskolája és a
Balatoni Limnológiai Kutatóintézet keretében

Témavezetők: Prof. Dr. Padisák Judit és Dr. Pirger Zsolt

Elfogadásra javaslom (igen / nem)

Elfogadásra javaslom (igen / nem)

.....

(aláírás)

.....

(aláírás)

Az értekezést bírálóként elfogadásra javaslom:

Bíráló neve: igen /nem

.....

(aláírás)

Bíráló neve: igen /nem

.....

(aláírás)

A jelölt az értekezés nyilvános vitáján% - ot ért el.

Veszprém,

.....

a Bíráló Bizottság Elnöke

A doktori (PhD) oklevél minősítése

.....

az EDHT elnöke

Családomnak, Nagymama emlékére

Tartalomjegyzék

Kivonat.....	8
Abstract.....	9
Abstrait	10
Az értekezésben használt rövidítések jegyzéke	11
1 Bevezetés	13
2 Irodalmi áttekintés.....	15
2.1 Az emberi eredetű gyógyszerhatóanyagok megjelenése felszíni vizekben ...	15
2.2 Orális fogamzásgátló hatóanyagok	16
2.2.1 Egy globális probléma bemutatása: a progesztogének.....	17
2.4. A jelenlegi helyzet Magyarországon	22
2.5 Fogamzásgátló hatóanyagok hatásai gerinctelen állatokra	24
2.6 Gerinctelen tesztállatok.....	27
2.6.1 A nagy mocsári csiga - <i>Lymnaea stagnalis</i>	27
2.6.2 Nagy vízibolha - <i>Daphnia magna</i>	31
3 Célkitűzés.....	35
4 Anyagok és módszerek	36
4.1 Kísérleti állatok.....	36
4.1.1 <i>L. stagnalis</i>	36
4.1.2 <i>D. magna</i>	36
4.2 Progesztogén kezelések.....	36
4.2.1 A <i>L. stagnalis</i>	37
4.2.2 A <i>D. magna</i>	38
4.3 <i>L. stagnalis</i> kísérletek.....	38
4.3.1 Embrionális fejlődés	38
4.3.2 Viselkedési tesztek.....	39

4.3.2.1 Embriók	39
4.3.2.2 Felnőtt egyedek	40
4.3.3 Molekuláris és sejtes vizsgálatok	41
4.3.3.1 Nukleotid szekvenálás, bioinformatika	41
4.3.3.2 DJ-1 ELISA	42
4.3.3.3 MAPK microarray	43
4.4 <i>D. magna</i> kísérletek	44
4.4.1 Növekedés és reprodukciós változások	44
4.4.2 Molekuláris és sejtes vizsgálatok	44
4.4.2.1 A GST expressziós szintjének vizsgálata	44
4.4.2.2 A teljes fehérjetartalom és a GST enzim aktivitása	45
4.5. Statisztikai vizsgálatok	46
5 Eredmények	48
5.1. A kezelések hatása a csigaembriók fejlődésére	48
5.2 Az embrionális viselkedési formákban megfigyelt változások	50
5.3 A felnőtt csigák mozgási és táplálkozási aktivitása	53
5.4. Azonosított stressz-aktivált protein kinázok	55
5.5. Celluláris változások a központi idegrendszerben	55
5.6 A kezelések hatása a <i>D. magna</i> növekedésére és szaporodására	56
5.7 A GST génexpressziója és enzimatis aktivitásának változása	59
6 Megbeszélés és következtetések	61
6.1 Az elvégzett kísérletek környezeti relevanciája	61
6.2 Progesztogének által kiváltott változások	62
7 Összefoglalás	68
8 Köszönetnyilvánítás	70
9 Irodalomjegyzék	71

10. Tudományos tevékenység adatai	87
Az értekezés témájához kapcsolódó magyar és idegen nyelvű közlemények	87
Az értekezés témájához közvetlenül nem kapcsolódó egyéb közlemények	87
Az értekezés témájához kapcsolódó magyar és idegen nyelvű prezentációk	88
Az értekezés témájához közvetlenül nem kapcsolódó egyéb prezentációk	89
11 Eredmények Tézisszerű összefoglalása	91
12 Results of the studies.....	94
13 Függelék.....	96

KIVONAT

A doktori értekezésben bemutatott kísérletek célja vízi gerinctelen modellállatokban progesztogén hatóanyagokkal történő hosszútávú terhelések (6, 21 nap) során kiváltott változások megfigyelése volt. A doktorjelölt a dolgozatában összefoglalta a különböző víztestekben előforduló progesztogének (progeszteron [PRG], levonorgesztrel [LNG], drospirenon [DRO], gesztodén [GES]) koncentrációját, majd megvizsgálta a környezetileg is releváns átlagos 1 és 10 ng L⁻¹, valamint a környezetben helyenként még mérhető extrém magas 100 és 500 ng L⁻¹ progesztogén keverék komplex élettani hatásait vízi makrogerinctelen (*Lymnaea stagnalis*) és zooplankton (*Daphnia magna*) szervezetekre nézve.

- (1) A doktorjelölt a *L. stagnalis* vizsgálatok esetében szignifikáns változásokat figyelt meg az embriók fejlődési idejében, pulzusszámban, táplálkozásában és csúszó mozgásának aktivitásában, valamint a felnőtt egyedek táplálkozási és mozgási aktivitásában. A kontroll csoporthoz képest minden alkalmazott kezelés felgyorsította az embrionális fejlődés idejét és a kapszula belső falán történő csúszási aktivitást is. A 10, 100 és 500 ng L⁻¹-es kezelések fokozták az embriók pulzusszámát, valamint a fiktív táplálkozási aktivitásukat (harapások száma). A 10, 100 és 500 ng L⁻¹-es keverék befolyásolta a felnőtt állatok táplálkozási aktivitását, míg az 1, 10 és 100 ng L⁻¹-es kezelések a mozgási aktivitást változtatták meg.
- (2) A doktorjelölt a *D. magna*-n történő vizsgálatok során jelentős molekuláris és sejtszintű változásokat figyelt meg. A qRT-PCR mérések alapján (6 nap) megállapította, hogy valamennyi alkalmazott progesztogén keverék fokozta a glutation S-transzferáz (GST) detoxifikáló enzim génexpresszióját, továbbá az aktív GST fehérje aktivitása is fokozódott 10, 100, és 500 ng L⁻¹-es kezelt csoportok esetében. A hosszútávú, 21 napos kezelések során megfigyelte, hogy az első peterakás a 10 ng L⁻¹-es csoport esetében hamarabb valósult meg, mint a kontroll csoportban, valamint az egy egyedre jutó maximális peteszám az 1 illetve 10 ng L⁻¹-es kezelt csoportoknál megnövekedett a kontroll csoporthoz képest.

ABSTRACT

The aim of experimental research presented in this thesis was to observe the effects of long-term (6, 21 days) progestogen exposure on invertebrate freshwater model species. In doing so, the concentrations of four progestogen compounds, progesterone [PRG], drospirenone [DRO], gestodene [GES], levonorgestrel [LNG], found in different bodies of water were summarised. Guided by this data, specimens of the great pond snail (*Lymnaea stagnalis*) and the water flea (*Daphnia magna*) were exposed to environmentally relevant average (1 and 10 ng L⁻¹) and extremely high (100 and 500 ng L⁻¹) equi-concentrations of mixtures of progestogens in order to investigate the possible physiological effects in these well-established ecotoxicological model organisms.

- (1) During the experiments with *L. stagnalis*, significant changes were observed on the embryonic development time, heart rate, feeding and gliding activities of the embryos as well as in the feeding and locomotion activity of adult specimens. All of the mixtures accelerated the embryonic development time and the gliding activity. Furthermore, the 10, 100, and 500 ng L⁻¹ mixtures increased the heart rate and feeding activity of the embryos. The 10, 100, and 500 ng L⁻¹ mixtures affected the feeding activity as well as the 1, 10, and 100 ng L⁻¹ mixtures influenced the locomotor activity of the adult specimens.
- (2) Investigating the impacts on *D. magna*, significant alterations were observed at molecular and cellular levels. The qRT-PCR measurements during the short-term exposure revealed that all of the mixtures increased the gene expression of glutathione S-transferase (GST) detoxification enzyme, moreover, the activity of GST was also significantly increased at the concentrations of 10, 100, and 500 ng L⁻¹. In the long-term exposure, the number of days until production of the first eggs was reduced at the 10 ng L⁻¹ concentration compared to control, furthermore, the maximum egg number per individual increased at the concentrations of 1 and 10 ng L⁻¹.

ABSTRAIT

Le but des expériences présentées dans cette thèse était d'observer les effets d'une exposition aux progestatifs sur deux espèces modèles d'invertébrés d'eau douce, à la fois à long terme (6 et 21 jours respectivement). Pour faire cela, des mélanges de quatre composés progestatifs - la progestérone, la drospirénone, le gestodène et le lévonorgestrel - ont été établis dans différents plans d'eau. Guidés par ces résultats, des spécimens de la grande limnée (*Lymnaea stagnalis*) et de la puce d'eau (*Daphnia magna*) ont été exposés aux mélanges de progestatifs dans des équiconcentrations moyennes pertinentes dans l'environnement (1 et 10 ng L⁻¹) ou extrêmement élevées (100 et 500 ng L⁻¹), afin d'étudier les effets physiologiques qui pourraient se produire chez ces organismes modèles bien établis en écotoxicologie.

- (1) Au cours des expériences avec *L. stagnalis*, des changements significatifs ont été observés dans le temps de développement embryonnaire, la fréquence cardiaque, les activités d'alimentation et de glisse des embryons ainsi que dans l'activité d'alimentation et de locomotion des spécimens adultes. Tous les concentrations induisent une accélération du temps de développement embryonnaire et de l'activité de glisse. De plus, les mélanges de 10, 100 et 500 ng L⁻¹ augmentent la fréquence cardiaque et l'activité alimentaire des embryons. Les mélanges à 10, 100 et 500 ng L⁻¹ ont affecté l'activité alimentaire ainsi que les mélanges à 1, 10 et 100 ng L⁻¹ ont influencé l'activité locomotrice des spécimens adultes.
- (2) Les études d'impact sur *D. magna*, ont révélé des changements significatifs aux niveaux moléculaire et cellulaire. Les mesures par qRT-PCR de l'expression de l'enzyme de détoxification glutathion S-transférase (GST) ont montré une augmentation pendant l'exposition à court terme dans tous les concentrations. De plus, l'activité de la GST était également significativement augmentée dans des concentrations de 10, 100, et 500 ng L⁻¹. Dans les expériences d'exposition à long terme, le nombre des jours qui s'écoulent avant la production des premiers œufs a été réduit dans la concentration de 10 ng L⁻¹ par rapport au témoin, lorsque le nombre maximal d'œufs par individu était plus important dans les concentrations de 1 et 10 ng L⁻¹.

AZ ÉRTEKEZÉSBEN HASZNÁLT RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ASTM - American Society of Testing Materials

BSA – (Bovine Serum Albumin) szarvasmarha-szérum albumin

DJ-1 – protein deglikáz 1

DRO – drospirenon

CREB – (cAMP Response Element-Binding Protein)

cDNA – (Complementary DNA) kiegészítő dezoxiribonukleinsav

EDC – (endocrin distruptive chemicals) endokrin rendszert károsító hatóanyag

E1 – ösztron

E2 – 17 β -ösztradiol

EE2 – 17 α / β -etinilösztradiol

E3 – ösztriol

ELISA – (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) enzimmel kapcsolt immunoszorbens teszt

GES – gesztodén

GST – glutation-S transzferáz enzim

HPLC –MS – (High Pressure Liquid Chromatography - Mass Spectrometry) nagynyomású folyadékkromatográfiával kapcsolt – tömegspektrometria

JNK1– (c-Jun N-terminal kinase)

LNG – levonorgesztrel

MAPK – (Mitogen-activated protein kinase) Mitogén-aktivált proteinkináz

NCBI – (The National Center for Biotechnology Information) Országos Biotechnológiai Információs Központ

OECD – (Organisation for Economic Co-operation and Development) Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet

p38alpha – (p38 mitogen-activated protein kinase)

PBS – (Phosphate Buffered Saline) foszfát puffer + só

PhAC – (Pharmacologically active compound) farmakológiailag aktív vegyület

PCR – (Polymerase Chain Reaction) polimeráz-lánreakció

PRG – progeszteron

RNS – ribonukleinsav

T – tesztoszteron

1 BEVEZETÉS

Az emberi eredetű gyógyszerhatóanyagok környezetben való megjelenése az 1980-as évektől került a tudományos érdeklődés középpontjába. A nagyműszeres analitika fejlődésével ma már számos adat ismert a gyógyszermolekulák és bomlástermékeik környezeti megjelenéséről és koncentrációjáról. A felszíni vizekben általában ng L^{-1} és $\mu\text{g L}^{-1}$ – es koncentráció tartományba detektálhatók, melynek alapján ezek a vegyületek a nano- és mikroszennyezők csoportjába sorolhatók (Snyder és mtsai, 2003). A felszíni vizekben eredetileg is megtalálhatók geológiai eredetű természetes szennyezők, de a xenobiotikumok legnagyobb része antropogén forrásokból, elsősorban kommunális szennyvizekből közvetlenül, vagy közvetve jut a természetbe. Ennek eredményeként a gyógyszermaradványok felhalmozódhatnak az üledékben, vagy bioakkumulálódhatnak a vízi szervezetek szöveteiben is. Az emberi eredetű gyógyszermaradványok közül az ökoszisztéma tekintetében az egyik legkockázatosabb csoportot a szteránvázis hormonok alkotják. A zsírdékony szteroid hormonok csoportjába tartoznak többek között az endogén nemi hormonok (pl. PRG), illetve az olyan szintetikus fogamzásgátló hatóanyagok, mint pl. a progesztinek, más néven progesztogének (vagy gesztogének) is.

Gazdasági szempontból a progesztogének hozzák az egyik legtöbb hasznot a gyógyszergyárak számára. Irodalmi adatok alapján ismert, hogy több, mint 100 millió nő fogyaszt ilyen szintetikus fogamzásgátló készítményeket, kortól, iskolai végzettségtől és társadalmi pozíciótól függően évente (Huezo és mtsai, 1998; Christin-Maitre, 2013). A fogamzásgátló prevalenciájában az 1960-as évek óta jelentős növekedés figyelhető meg. A fejlődő országokban ez a szám 2009-ben megközelítette a 70%-ot. A termékenységi ráta az 1970-es évek elején 4,7 születésről a 2000-es évek végére 2,6 születésre csökkent, elsősorban a fogamzásgátlók gyakori használatának köszönhetően (Christin-Maitre, 2013). A szintetikus fogamzásgátlóknak, valamint ezek metabolitjainak egy része, biológiailag aktív formában ürül ki az emberi szervezetből a kiválasztás során. Ezek a szerves nano- és mikroszennyezők a három lépcsős (mechanikai, kémiai, biológiai) szennyvíztisztítási eljárások során, hatóanyag csoporttól függően, csak részben eliminálódnak, így, biológiai aktivitásukat megőrizve, kikerülnek a tisztított szennyvízzel a felszíni vizekbe, ahol jelenlétük biológiai kockázatot jelenthet a vízi ökoszisztéma számára. Ezek a hatóanyagok befolyásolhatják például egy adott faj populációdinamikáját azáltal, hogy csökkenő egyedszámot, rendellenes ivari fejlődést eredményezhetnek, de hozzájárulhatnak a zsíryanagcsere felborulásához is, vagy

mindezek eredményeként akár egyes fajok lokális kipusztulását is okozhatják (Liu és mtsai, 2011; Orlando és mtsai, 2014, Pirger és mtsai. 2015). Annak ellenére, hogy a környezetben mért progesztogének koncentrációja általában alacsony, az együttes jelenlétükből adódóan (lehetséges szinergizmusok következtében) még kis koncentrációkban is hatással lehetnek a vízi életközösségek egyedeire és befolyásolhatják azok élettani folyamatait.

Többféle hormonkeverékeket használó, valós környezeti becslést adó kísérletek eredményeit már korábban is leírták a kutatók (Runnalls és mtsai, 2013; Safholm és mtsai, 2015; Zucchi és mtsai, 2014), de csak a progesztogének hatását vizsgáló, gerinces, vagy gerinctelen tesztállatokon végzett megfigyelésekből még kevés megfigyelés született ez idáig. A doktori disszertációban bemutatott eredmények ezt a hiányt igyekeznek pótolni.

2 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 Az emberi eredetű gyógyszerhatóanyagok megjelenése felszíni vizekben

Napjaink felgyorsult, városiasodott világában egyre több, az ipar által előállított szintetikus anyagot használunk. Ugyanakkor e szintetikus anyagok esetleges szennyezését követően, azok pl. felszíni vizekből történő eltávolítása, kiszűrése többségében még nem megoldott feladat. Az elmúlt néhány évben egyértelművé vált, hogy a farmakológiailag aktív vegyületek - mint például a vízi ökoszisztémákban megjelenő emberi eredetű szennyező hatóanyagok - kihívást jelentenek a gerinces és gerinctelen állatok számára egyaránt, ezért környezeti hatásaik miatt oda kell rájuk figyelnünk a jövőben (Can és mtsai, 2014; Liu és mtsai, 2011; Maász és mtsai, 2019; Postigo és mtsai, 2010). Mivel a tabletták hatóanyag tartalma magas, nem kerül sor azok teljes lebontására (metabolizálására) a szervezetben, így ezek a gyógyszerhatóanyagok a normál élettani folyamatok eredményeképpen, sok esetben változatlanul, biológiailag aktív formában ürülnek a környezetbe. Az emberi terhelések egyrészt természetes úton, pl. vizelettel, másrészt pedig – a külsőleg alkalmazott gyárhatóanyagok esetében – a fürdővízzel jutnak a helyi csatornahálózatba, majd onnan tovább a szennyvíztisztítóba. Számos irodalmi adat igazolja, hogy a jelenleg alkalmazott, általában háromlépcsős szennyvíztisztítási eljárások (fizikai szűrés – vízben nem oldódó lebegő anyagok eltávolítása, ülepítés, lefőlözés; biológiai kezelés – nitrifikáció, denitrifikáció; fizikai-kémiai kezelés – fertőtlenítés, ultraszűrés, fordított ozmózis stb.) nem képesek teljes egészében kiszűrni (hatóanyag típustól függően, csupán 10–30%) a szintetikus hatóanyagokat a városi kommunális, vagy ipari szennyvizekből (Ying és mtsai, 2009; Nieto és mtsai, 2010; Liu és mtsai, 2011; Behera és mtsai, 2011). Ennek következtében a hatóanyagok, részben aktív formában, a tisztított szennyvízzel kijutnak az élővizekbe és ott potenciális veszélyforrásokká válnak a vízi ökoszisztémára nézve (Zeilinger és mtsai, 2009; Liu és mtsai, 2011; Kroupova és mtsai, 2014; Zrinyi és mtsai, 2017). Megemlítendő, hogy a tisztítási hatásfok növelésének érdekében bizonyos esetekben UV sugárzást is alkalmaznak a szintetikus hatóanyagok elbontásához. Azonban az alkalmazott UV-roncsolás megítélése kérdéses, mert egyre több az olyan tanulmány, amely arról számol be, hogy a stabil kiindulási molekulaszervezetek, mint pl. a szteránváz is, megbontható ugyan, de biológiai szempontból még veszélyesebb, akár nagyobb toxicitású, többségében még ismeretlen bomlástermékek képződhetnek (Kunz és mtsai, 2009).

Az emberi eredetű gyógyszerhatóanyagok környezetben való megjelenése nem új keletű probléma. Környezeti toxikológusok már az 1970-es évek elején felhívták a figyelmet erre a lehetséges környezeti kockázatra. A felszíni vizekben kimutatható hatóanyagszintek a ng L^{-1} és a $\mu\text{g L}^{-1}$ koncentráció tartományba esnek. Ezek a nano- és mikro-szennyezők a természetben könnyen felhalmozódhatnak és idővel már a ng L^{-1} -es koncentrációk is számos változást okozhatnak, az egyébként stabil ökoszisztémákban. Például beépülnek a táplálkozási láncokba, megzavarják a természetes anyagforgalmat (pl. zsírsavcsere), illetve az életközösségek és az egyes fajok természetes (pl. szaporodási) viselkedését is (Contardo-Jara és mtsai, 2011; Liu és mtsai, 2011; Orlando és Ellestad, 2014; Runnalls és mtsai, 2015).

A felszíni vizekben kimutatható számos gyógyszerhatóanyag csoport közül kutatómunkám során többségében az orális fogamzásgátló hatóanyagokkal foglalkoztam. Így a releváns irodalmi háttér bemutatása után a disszertációm további részében csak ezekre a vegyületekre fókuszálok.

2.2 Orális fogamzásgátló hatóanyagok

A női fogamzásgátló tablettákban progeszterogén és/vagy ösztrogén típusú hormonális hatóanyagok találhatóak. Megkülönböztethetünk egy-, két- és háromfázisú készítményeket, attól függően, hogy hogyan változik az egyes komponensek száma és egymáshoz viszonyított aránya. A ma használatos fogamzásgátló tabletták egyes típusai - a hatóanyagok folyamatos fejlesztésével - több évtized alatt jöttek létre, amire elérték az elvárt hatékonyságukat. A folyamatos fejlesztéseknek köszönhetően megkülönböztethetünk első-, második-, harmadik- és negyedik generációs tablettákat, melyek között a különbség az $17\alpha/\beta$ -etinilösztadiol (EE2) szempontjából, annak mennyiségében keresendő. Az első generációs tabletták még 50-150 μg EE2-t tartalmaztak, majd később a harmadik generációsokban mennyiségük 20 μg -ra csökkent (Roy és mtsai, 1980; Basdevant, 1979).

Az ökoszisztémára gyakorolt terhelés szempontjából hosszú ideig az ösztrogének voltak a legszélesebb körben vizsgált fogamzásgátló vegyületek. Hatásukat különböző gerinctelen (Hutchinson, 2002; Islam és mtsai, 2020; Kashian és Dodson, 2004; Ketata és mtsai, 2008; Matthiessen és Gibbs, 1998; Torres és mtsai, 2015; Zou és Fingerman, 1997; Zheng és mtsai, 2020) és gerinces vízi fajokon (Bhandari és mtsai, 2015; Caldwell és mtsai, 2008; Costa és mtsai, 2010; Huang és mtsai, 2015) mutatták ki

ez idáig. Az elmúlt években a fogamzásgátló gyógyszerek másik hatóanyag típusa került az ökotoxikológia vizsgálatok középpontjába, úgy mint a PRG és annak szintetikus analógjai (pl. DRO, GES és LNG) a progesztogének (Sitruk-Ware és Nath, 2010). A doktori munkám során a progesztogének ökoszisztémára gyakorolt lehetséges hatásait vizsgáltam, így a továbbiakban csak ezeket a hatóanyagokat részletezem.

2.2.1 Egy globális probléma bemutatása: a progesztogének

A természetes PRG egy női nemi hormon, amely a szexuálisan aktív szakaszban lévő nők petefészkében termelődik, a tüszőrepedést (*ovulatio*) követően, a tüszőhám és a belső tok sejtjeinek átalakulásával kialakuló sárgatestben (*corpus luteum*). A hormon alapját szteránváz képezi - bár nem sorolják a klasszikus, mellékvesekéreg-eredetű szteroidok (mineralokortikoidok, glukokortikoidok, androgének) közé. Hatására a méhnyálkahártya olyan fejlett stádiumba kerül, amely vastagságával, tápanyag-felhalmozásával és mirigyeinek tápanyagtermelésével kedvező körülményeket teremt a megfelelő fejlettséget elért megtermékenyített petesejt beágyazódásához és méhlepény (*placenta*) kialakulásához. A sárgatest továbbra is fennmarad, ha a terhesség bekövetkezik, így hormonjaival védi a méhnyálkahártyát és meggátolja a méhizomzat összehúzódásait. Abban az esetben, ha terhesség nem következik be, a PRG szint leesik, a méhnyálkahártya leválik és kilökődik (Szentágothai és Réthelyi, 1989). A férfiak esetében a PRG elsősorban az anyagcsere folyamatokban játszik szerepet. A férfi szervezet ebből a hormomból képes előállítani a férfiak nemi jellegét meghatározó nemi hormont, a tesztoszteront (T). A PRG-t a férfiakban a mellékvesék és a herék is termelik (Sumpter és Jobling 1995).

Drospirenon

A PRG szintetikus formáit összefoglaló fogamzásgátló progesztogének csoportjába tartozó DRO-t 1976-ban szabadalmaztatták, majd 2000-ben vezették be orvosi használatra (Ravina, 2011). „Negyedik generációs” progesztogénnek is nevezik (Hatcher és mtsai, 2011). 2017-ben az Egyesült Államokban az egyik leggyakrabban felírt gyógyszer volt az EE2-al kombinált formája (Drug Usage Statistics, 2020). A DRO-t ösztrogénnel kombinálva többek között gender átalakító hormonterápiákban alkalmazzák (Majumder és Sanyal, 2017). Megállapították, hogy a posztmenopauzás nők esetében a DRO és E2 keveréke növeli a csontok ásványi sűrűségét és csökkenti a csonttörések előfordulását is (Christiansen, 2005; Whitehead, 2006). Ezenkívül a DRO az 17 β -ösztradiol-al (E2) alkalmazva kedvezően befolyásolja a koleszterin és a triglicerid

szintjét is (zsírsanyagcsere), és csökkenti a vérnyomást a magas vérnyomású nők esetében (Archer, 2007). Igen erősen antiandrogén hatású sárgatesthormon (azaz PRG) analóg, így gátolja a T közvetítését.

Levonorgesztrel

A progesztogén csoport másik ismert tagja a LNG, amit 1960-ban szabadalmaztattak, és 1970-ben az EE2-al együtt vezettek be orvosi használatra. Progesztogén aktivitásának köszönhetően a LNG antigonadotrop hatású, azaz képes mind a nőkben, mind a férfiakban megakadályozni a termékenységet és a nemi hormonok termelését. Bőrtapasz formában a LNG és az E2 kombinációját nők esetében hormonpótlónak használják a menstruáció megszűnése után, olyan tünetek kezelésére, mint például: a hőhullámok, vagy a csonttritkulás. 2016-ban ez volt a 223. leggyakrabban felírt gyógyszer az Egyesült Államokban (Drug Usage Statistics, 2020).

Gesztodén

A GES szintén erősen antigonadotrop progesztogén és hatása körülbelül háromszor erősebb, mint a LNG-é. A GES-t 1975-ben szintetizálták, és 1987-ben vezették be gyógyászati célokra (Kuhl és mtsai, 1995). Fogamzásgátló tablettaként széles körben forgalmazzák az egész világon, míg menopauzás hormonterápiában csupán néhány országban alkalmazzák. A GES használatát az Egyesült Államokban nem engedélyezik (Becker, 2001; Jiang és Weili, 2016). A GES csak EE2-vel kombinálva kapható tableta formájában. Irodalmi adatok alapján ismeretes, hogy mindössze 1%-a választódik ki a vizelettel változatlan, biológiailag aktív formában (Sitruk-Ware és mtsai, 2010; Besse és mtsai, 2009), vagyis feltehetően a környezetben alacsonyabb koncentrációban fog megjelenni eredeti formájában, mint pl. a PRG.

Napjainkban az emberi eredetű progesztogén hormonok váltak az egyik legjobban tanulmányozott környezetszennyező molekulákká, hiszen - mint endokrin rendszert megzavarni képes hatóanyagok - veszélyesek a vízi és szárazföldi ökoszisztémák számára egyaránt. 1977-ben mutattak ki először hormonmaradványokat az Egyesült Államok területén, majd 1985-ben olvashattunk első alkalommal ng L^{-1} koncentráció tartományban az ösztrogén és a progesztogén típusú vegyületek eredeti formában való megjelenéséről élővizekben. Ismeretes, hogy a szteroid hormonok általában nem mutatnak akut toxicitást, de hatásuk akár több generációval később is jelentkezhet egyes populációkban. A vízi környezetbe kerülve, az amúgy nem célszervezeteknek tekintett élőlények szaporodására és fejlődésére hatnak elsősorban. 2017-ben publikált irodalmi adatokból

ismeretes, hogy a szteroid szennyezéseknek széleskörű a génállományt (genotoxikus), az idegrendszert (neurotoxikus) és az ivarsejtkezdeményeket károsító hatásuk is van az emberi szervezetben.

Az analitikai technikák (pl. nagynyomású folyadékkromatográfiával kapcsolt – tömegspektrometria [HPLC-MS módszer]) érzékenysége növekedett. Ezért a kimutathatósági szintek jelentősen csökkentek, ennek köszönhetően egyre több szennyvíz be- és kifolyóból, felszíni és akár ivóvízből is kimutathatóvá váltak a különböző szintetikus nemi hormonok, a néhány ng L⁻¹ koncentráció tartománytól gyakran a több száz ng L⁻¹ koncentráció tartományig (Aris és mtsai, 2014; Runnalls és mtsai, 2015). A nemzetközi és hazai irodalmi adatokat feldolgozva kutatócsoportunk összefoglalta a különböző felszíni vizekben kimutatott progesztogének koncentrációs értékeit, feltüntetve az alkalmazott analitikai módszereket is. (**1. táblázat**).

Progesztogének	Víztest neve	MEC ng L ⁻¹	Analitikai módszer	Referencia
PRG	Balaton vízgyűjtő területe, Magyarország	0,23 – 13,67	HPLC-MS/MS	Avar és mtsai, 2015
	Balaton vízgyűjtő területe, Magyarország	0,60 – 2,30	SFC-MS/MS	Maász és mtsai, 2019
	Felszíni víz, Rio de Janeiro, Brazília	0,51 – 47,20	LC-MS/MS	Kuster és mtsai, 2009
	Lee folyó, Írország	6,00	GC-MS	Aherne és mtsai, 1984
	Papírgyári szennyvíz, Fenholloway folyó, USA	< 10,00	HPLC-MS/MS	Jenkins és mtsai, 2003
	Városi folyók, Bejing, Kína	26,00	LC-MS/MS	Chang és mtsai, 2009
	Hóolvadék, Wisconsin, USA	37,00	HPLC-MS/MS	DeQuattro és mtsai, 2012
	Legelővidéki felszíni víz, California, USA	27,00	GC-MS/MS	Kolodziej és Sedlak, 2007
	Mezőgazdasági felszíni vizek, Pennsylvania, USA	7,35 – 11,81	GC-MS	Velicu és Suri, 2009
	Llobregat folyó és ivóvíz, Barcelona, Spanyolország	≤ 1,39	LC-MS/MS	Kuster és mtsai, 2008
	Felszíni és talajvíz, Franciaország	1,70 – 4,10	LC-MS/MS (ESI)	Vulliet és mtsai, 2008
	Felszíni és ivóvíz, Japán	0,06 – 0,09	LC-MS/MS	Chang és mtsai, 2008
	Felszíni és ivóvíz, Conghua, Kína	1,20 – 2,50	UHPLC-MS/MS	Liu és mtsai, 2014
	Felszíni és ivóvíz, Baden, Svájc	4,00 – 10,00	LC-MS/MS	Ammann és mtsai, 2014
	Danshui folyó felső szakasza, Guandong, Kína	0,50 ± 0,10	RRLC-MS/MS	Liu és mtsai, 2011
	Danshui folyó alsó szakasza, Guandong, Kína	2,50 ± 0,10	RRLC-MS/MS	Liu és mtsai, 2011
	Piracicaba folyó, Brazília	0,58	LC-ESI-MS/MS	Torres és mtsai, 2015
	Felszíni víz, USA	0,199	GC-MS	Kolpin és mtsai, 2002
	Szennyvíztisztító telep kifolyója, Belgium	2,50 ± 0,70	GC-MS/MS	Pauwels és mtsai, 2008
	Szennyvíztisztító telep kifolyója, Japán	0,31 – 0,37	LC-MS/MS	Chang és mtsai, 2008
Szennyvíztisztító telep kifolyója, Bohai, Kína	0,80 – 2,30	RRLC-MS/MS	Liu és mtsai, 2012	
Szennyvíztisztító telep kifolyója, USA	2,90	LC-MS/MS	Yost és mtsai, 2014	

	Szennyvíztisztító telep kifolyója, Beijing, Kína	6,00	UPLC-MS/MS	Fan és mtsai, 2011
	Szennyvíztisztító telep befolyója, Belgium	4,80 – 33,00	GC-MS/MS	Pauwels és mtsai, 2008
	Szennyvíztisztító telep befolyója, Japán	3,10 – 10,00	LC-MS/MS	Chang és mtsai, 2008
	Szennyvíztisztító telep befolyója, Beijing, Kína	66,00 ± 36,00	LC-MS/MS	Chang és mtsai, 2011
	Szennyvíztisztító telep befolyója, Huiyang, Guangdong, Kína	6,10 ± 0,30	RRLC-MS/MS	Liu és mtsai, 2011
	Szennyvíztisztító telep befolyója, Meihu, Guangdong, Kína	5,40 ± 0,60	RRLC-MS/MS	Liu és mtsai, 2011
	Szennyvíztisztító telep befolyója, Bohai, Kína	38,00 – 108,00	RRLC-MS/MS	Liu és mtsai, 2012
	Szennyvíztisztító telep befolyója, USA	10,10	LC-MS/MS	Yost és mtsai, 2014
	Szennyvíztisztító telep befolyója, Beijing, Kína	57,00	UPLC-MS/MS	Fan és mtsai, 2011
	Szennyvíztisztító telep befolyója, Baden, Svájc	4,15	LC-MS/MS	Ammann és mtsai, 2014
	Állatfarm szennyvize, Bohai, Kína	56,70 – 2470,00	RRLC-MS/MS	Liu és mtsai, 2012
	Állatfarm szennyvize, Kína	29,00 – 11,90	RRLC-MS/MS	Liu és mtsai, 2012
	Állatfarm szennyvize, Jiangmen, Kína	5024,00	UHPLC-MS/MS	Liu és mtsai, 2014
	Állatfarm szennyvize, USA	186,00 – 1430,00	LC-MS/MS	Yost és mtsai, 2014
	Állatfarm szennyvize, Colorado, Denver	< 7,00 – 98,90	GC-MS/MS	Yang és mtsai, 2012
	Állatfarm (A) szennyvize, Kína	1,70 – 9330,00	UHPLC-MS/MS	Liu és mtsai, 2015
	Állatfarm (B) szennyvize, Kína	2,31 – 5402,00	UHPLC-MS/MS	Liu és mtsai, 2015
	PRG koncentráció tartománya	0,06 – 9330,00		
LNG	Balaton vízgyűjtő területe, Magyarország	0,85 – 3,40	HPLC-MS/MS	Avar és mtsai, 2016
	Balaton vízgyűjtő területe, Magyarország	1,90 – 49,40	SFC-MS/MS	Maász és mtsai, 2019
	Felszíni és talajvíz, Franciaország	5,30-11,00	LC-MS/MS	Vulliet és mtsai, 2008
	Átlagos felszíni vizek, Rhône-Alpesi régió, Franciaország	3,60	LC-MS/MS	Vulliet and Cren-Olive, 2011
	Folyóvíz, Malaysia	38,00	LC-MS/MS	Al-Odaini és mtsai, 2010
	Anoia és Cardener folyók, Catalonia, Spanyolország	< 0,20 – 4,00	LC-MS	Petrovic és mtsai, 2002
	Szennyvíztisztító telep kifolyó, Catalonia, Spanyolország	< 0,20 – 4,00	LC-DAD-MS	Lopez de Alda és mtsai, 2002
	Szennyvíztisztító telep kifolyó, Seine folyó, Franciaország	< 2,50 – 7,20	GC-MS	Labadie és Budzinski, 2005
	Szennyvíztisztító telep kifolyó, Jalle d'Eysines folyó, Franciaország	< 2,00 – 5,00	GC-MS	Labadie és Budzinski, 2005
	Szennyvíztisztító telep kifolyó, Lyon, Franciaország	0,90- 17,90	LC-MS	Vulliet és mtsai, 2007
	Szennyvíztisztító telep kifolyó, Kína	1,10	HPLC	Pu és mtsai, 2008
	Szennyvíztisztító telep kifolyó, Kína	1,30	ELISA	Pu és mtsai, 2008
	Szennyvíztisztító telep kifolyó, Montreal, Canada	30,00	LC-MS/MS	Viglino és mtsai, 2008
	Szennyvíztisztító telep befolyó, Funan Chengdu folyó, Kína	8,10	HPLC	Qiao és mtsai, 2009
	Szennyvíztisztító telep kifolyó, Funan Chengdu folyó, Kína	74,30	HPLC	Qiao és mtsai, 2009
	Szennyvíztisztító telep befolyó, Montreal, Kanada	150,00 – 170,00	LC-MS/MS	Viglino és mtsai, 2008
	Szennyvíztisztító telep befolyó, Kína	6,50	ELISA	Pu és mtsai, 2008
	Szennyvíztisztító telep befolyó, Kína	5,60	HPLC	Pu és mtsai, 2008

	Szennyvíztisztító telep befolyó, Spanyolország	< 0,20 – 16,10	LC-MS	Petrovic és mtsai, 2002
	Szennyvíztisztító telep befolyó, Catalonia, Spanyolország	< 0,20–16,00	LC-DAD-MS	Lopez de Alda és mtsai, 2002
	Szennyvíztisztító telep befolyó, Beijing, Kína	4,90 ± 1,20	LC-MS/MS	Chang és mtsai, 2011
LNG koncentráció tartománya		0,20 – 170,00		
GES	Duna, Magyarország	3,60	LC-MS/MS	Neale és mtsai, 2015
	Szennyvíztisztító telep kifolyó, Beijing, Kína	0,61-8,30	UHPLC-MS/MS	Shen és mtsai, 2018
GES koncentráció tartománya		0,61-8,30		
DRO	Balaton vízgyűjtő területe, Magyarország	0,26 – 4,30	HPLC-MS/MS	Avar és mtsai, 2016

1. táblázat: A vízmintákban kimutatható különböző szintetikus progesztogén hatóanyagok mért környezeti koncentrációja (MEC) és összesített koncentráció tartománya (kiemelve). HPLC-MS/MS -nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometria, UHPLC-MS/MS - ultranagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával kapcsolt tandem tömegspektrometria, RRLC-MS/MS - gyors rezolúciós folyadékkromatográfiával kapcsolt tandem tömegspektrometria, SFC-MS/MS - szuperkritikus folyadékkromatográfiával kapcsolt tandem tömegspektrometria, GC-MS - gázkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometria, ELISA - enzimvel kapcsolt immunoszorbens tesz

Ezek alapján a legmagasabb progesztogén koncentrációkat (> 1000 ng L⁻¹) állattenyésztő telepekhez kapcsolódó vízelvezetőkől/vízfolyásokból mutatták ki Kínában és az Egyesült Államokban (Orlando és mtsai, 2014; Fent, 2015; Chang és mtsai, 2011). Alacsonyabb koncentrációkat (<400 ng L⁻¹) mérték a szennyvíztelepek be- és kifolyóiban. Az ökológiai szempontból számunkra releváns felszíni vizekben (patakokban, folyókban, tavakban) a kimutatott progesztogén típusú hatóanyagok koncentrációi (<50 ng L⁻¹) a szennyvíztelepek tisztított kifolyóiban mért értékekhez közelítenek.

Európában először 1985-ben, Aherne és munkatársai (1985) mutatták ki a PRG hormont az ivóvízből, 6 ng L⁻¹ koncentrációban, valamint még ebben az évben megjelent az első olyan összefoglaló közlemény, amiben emberi eredetű szintetikus szteroid hormonok jelenlétét írták le szennyvízkifolyóban, folyókban, ivóvízben 5–10 ng L⁻¹ koncentrációban (Richardson és Bowron, 1985). Más kutatócsoportok analitikai vizsgálatai alapján megállapítható, hogy a PRG, DRO, GES és LNG tipikusan néhány ng L⁻¹ koncentrációban detektálható a felszíni vizekben (Chang és mtsai, 2011; Fent, 2015; Liu és mtsai, 2011; Orlando és Ellestad, 2014; Shen és mtsai, 2018; Vulliet és mtsai, 2008; Yost és mtsai, 2014). Azonban ismeretes, hogy ezek a hormonmaradványok már 10 ng L⁻¹ koncentrációban képesek befolyásolni a vízi szervezetek élettani folyamatait (Tillmann és mtsai, 2001; Giusti és mtsai, 2014; Fent, 2015; Avar és mtsai, 2016).

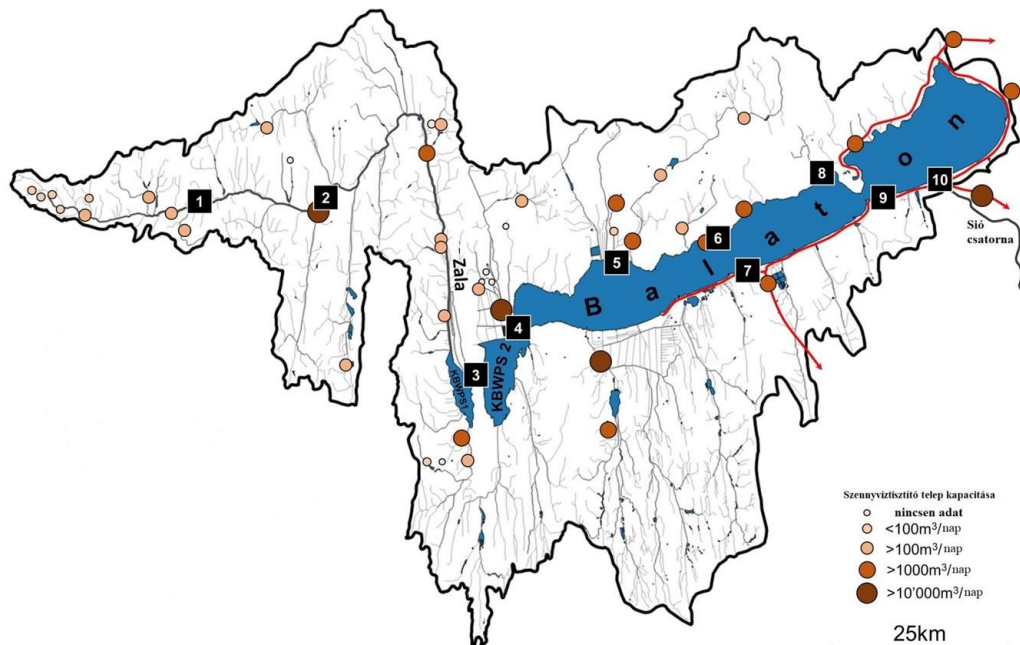
2.4. A jelenlegi helyzet Magyarországon

A magyarországi folyók és tavak gyógyszerhatóanyag szennyezettségéről viszonylag kevés információ állt rendelkezésünkre, azonban az elmúlt 10 évben több hazai munkacsoport is széles körű felméréseket végzett ezen a területen.

A Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem Vegyészmérnöki és Biomérnöki Karán, illetve az Eötvös Loránd Tudományegyetem Természettudományi Karán vizsgálták a Duna kommunális szennyvízterheléséből adódó szennyezettségét a budapesti várostérségben. Az analitikai munka keretében többek között számos hormontípusú hatóanyag-molekulát is kimutattak. Az endogén szteroidok közül például a kortizol, a T, az E2 és a PRG ($\geq 4 \text{ ng L}^{-1}$), míg a szintetikus hatóanyagok közül az EE2 ($\geq 2,5 \text{ ng L}^{-1}$) fordult elő (Andrási és mtsai, 2013; Helenkár és mtsai, 2010). Az elmúlt években a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alap (NKFIA) több, mint egymilliárd forintos támogatásával, a Nemzeti Versenyképességi és Kiválósági Program (NVKP) keretében nagyszabású kutatás-fejlesztési projekt valósult meg Budapest és a várost körülvevő ingázási zóna népesség-dinamikájával, illetve a lakossági fogyasztás által okozott egyes szennyezésekkel kapcsolatban. A Csillagászati és Földtudományi Kutatóközpont Földrajztudományi Intézete (Budapest) vezetésével, a Balatoni Limnológiai Kutatóintézet (Tihany) és a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Igazságügyi Orvostani Intézet közreműködésével innovatív analitikai módszerekkel (HPLC-MS) vizsgálták a talajba és a budapesti várostérség felszíni vizeibe jutó gyógyszerészarmazékok tér- és időbeli dinamikáját és ezek lehetséges hatásait. Ezen kívül, a Duna magyarországi szakaszán számos humán eredetű aktív hatóanyagot (pl. alkaloidok, antiepileptikumok, kardiovaszkuláris gyógyszerek, antibiotikumok) mutattak ki, beleértve a szteroid hormonokat is. A progesztogén típusú hormonok közül a LNG-t ($9,82 \text{ ng L}^{-1}$), míg az ösztrogének közül az ösztront (E1) ($0,09\text{-}2,33 \text{ ng L}^{-1}$), az E2-t ($0,11\text{-}0,40 \text{ ng L}^{-1}$), és az EE2-t ($0,10 \text{ ng L}^{-1}$) mérték ki a vízrendszerből (Kondor és mtsai, 2020). A budapesti és a környéki termálvizek kifolyóinak vizsgálata szintén relatíve nagy mennyiségű farmakológiailag aktív vegyület szennyezettségéről árulkodott. A szteroidok közül az E1 ($0,10\text{-}112,59 \text{ ng L}^{-1}$), E2 ($0,05\text{-}39,48 \text{ ng L}^{-1}$), EE2 ($0,64\text{-}98,33 \text{ ng L}^{-1}$), E3 ($0,07\text{-}2,09 \text{ ng L}^{-1}$), T ($0,61\text{-}97,31 \text{ ng L}^{-1}$), PRG ($0,51\text{-}10,24 \text{ ng L}^{-1}$) és LNG ($1,06\text{-}8,19 \text{ ng L}^{-1}$) jelenlétét mutatták ki a kutatók változó koncentrációkban (Jakab és mtsai, 2020).

A Balatont és annak vízgyűjtő területét (*1. ábra*) az emberi eredetű vegyületek, beleértve a szteroid hormonokat is, szempontjából elsőként, a Balatoni Limnológiai

Kutatóintézet, Nemzeti Agykutatási Program által támogatott, Adaptív Neuroetológiai Kutatócsoportjának munkatársai mérték fel. Eredményeik alapján ismert, hogy a vizsgálati területen a célzott 134 gyógyszer hatóanyagból 73-at mutattak ki a vízmintákból, amelyeket az alkaloid, antiepileptikus, antidepresszáns, szorongásoldó, érzéstelenítő, görcsoldó, opioid származékok és stimuláns, vagy hallucinogén hatóanyagcsoportokba soroltak (Maász és mtsai, 2019). Pirger és mtsai (2015) a disszertáció szempontjából releváns fogamzásgátló hatóanyagok közül az E2-t ($0,07\text{--}0,23\text{ ng L}^{-1}$) és az EE2-t ($0,13\text{ ng L}^{-1}$) a Balaton vizében is kimutatták már a 2010-es évek elején. A Zalában és a Hévíz–Páhoki csatornában viszonylag magasabb E2 ($0,55$ és $0,26\text{ ng L}^{-1}$) és EE2 ($0,68$ és $0,52\text{ ng L}^{-1}$) koncentrációkat detektáltak (Avar és mtsai, 2016a). Érdeemes megjegyezni, hogy az Európai Parlament 2014-ben hozott döntése alapján az ösztrogének az úgynevezett veszélyes anyagok listájára kerültek; az E2 esetén $0,03\text{ ng L}^{-1}$, míg az EE2-nél $0,40\text{ ng L}^{-1}$ határértékekkel. Jól látható tehát, hogy, az ösztrogének tekintetében a megadott határértékeknél magasabb koncentrációkat mutattak ki a kutatók a Balaton vízrendszerében. A progesztogén típusú fogamzásgátló hatóanyagok közül a PRG-t ($0,23\text{--}13,67\text{ ng L}^{-1}$), az LNG-t ($0,85\text{--}3,40\text{ ng L}^{-1}$) és a DRO-t ($0,26\text{--}4,30\text{ ng L}^{-1}$) 53 mintavételi pontból 21 helyen mutatta ki a tihanyi kutatócsoport (Avar és mtsai, 2016b; Maász és mtsai, 2019). A progesztogének policiklikus szteránváza, mint kémiai szerkezet (lásd *Függelék 1. ábra*), rendkívül stabil és nagymértékben ellenáll a környezeti degradációnak, de az etinilcsoport kivételével az egyes hormonok karakterisztikáját kialakító funkciós csoportok már kevésbé stabilak. Így a progesztogén hormonok a környezeti- és/vagy biodegradáció következtében átalakulnak (pl. PRG \rightarrow T) és más jelátviteli útvonalakat aktiválnak (Ojoghoró és mtsai, 2017). Ugyanakkor pl. a Balaton vízrendszerében, a szezonális terhelést is figyelembe véve, a progesztogének állandó terhelése és jelenléte figyelhető meg. Így összességében - a viszonylag alacsony környezeti koncentrációk ellenére is számolni kell a progesztogének specifikus, vagy aspecifikus hatásával, ugyanis folyamatos és egyidejű jelenlétük egy hosszantartó környezeti terhelést jelenthet a Balatonban élő, egyébként nem célszervezetek számára is.



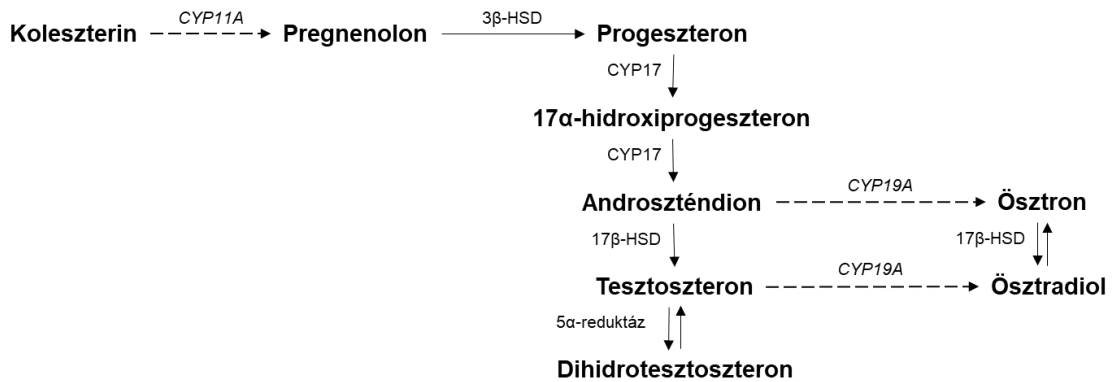
1. ábra: A Balaton és vízgyűjtő területe. A számozott téglalapok (1-10) a 10 mintavételi helyet jelölik. A különböző méretű és színű körökkel a különböző kapacitású szennyvíztisztító telepeket jelöltük. A piros vonal a szennyvízelvezető csatornát, a piros nyilak pedig a szennyvíz kifolyás irányát jelölik a vízgyűjtőről. Maász és mtsai, 2019 alapján, módosítva.

2.5 Fogamzásgátló hatóanyagok hatásai gerinctelen állatokra

Számos tanulmányból ismert, hogy a vízi gerinctelen és gerinces szervezetek kifejezetten érzékenyek a szintetikus fogamzásgátló hatóanyag maradványok szennyezéseire (Frankel és mtsai, 2016; Giusti és mtsai, 2014; Maász és mtsai, 2017; Tillmann és mtsai, 2001; Zrinyi és mtsai, 2017, Svigruha és mtsai, 2020; 2021). Ezek a szintetikus fogamzásgátló hormonok, mint endokrin rendszert károsító, ún. EDC-k ismertek. Az EDC-k olyan alacsony toxicitású aktív hatóanyagok, amelyek akár egyetlen kontaminációt követően is meg tudják változtatni a különböző gerinctelen állatok - például puhatestűek - fiziológias folyamatait. Általánosságban megállapítható, hogy sok szakirodalmi adat áll rendelkezésünkre a gerinctelenek esetében az aktív hatóanyagok fejlődésre- és a különböző viselkedési mintázatokra (pl. reprodukció, táplálkozás, mozgás, stb.) gyakorolt moduláló hatásairól. Ugyanakkor a progesztogén szennyezés élettani hatásairól kevesebb kísérleti adatot ismerünk a vízi gerinctelen, mint a gerinces fajok esetében. Továbbá meg kell jegyezni azt is, hogy hosszú ideje folyik a vita arról, hogy a környezetben előforduló természetes (gerinces eredetű) és szintetikus nemi hormonok egyáltalán képesek-e befolyásolni a gerinctelen szervezetek neuroendokrin rendszerét és

fiziológiai folyamatait (Alzieu, 2000; Amorim és mtsai, 2019; Fodor és mtsai, 2020b; Matthiessen és Gibbs, 1998; Scott, 2012, 2018; Tran és mtsai, 2019).

A gerinces eredetű szteroidok jelenlétét már számos alkalommal vizsgálták a puhatestűekben és az ízeltlábúakban (Fernandes és mtsai, 2010; Giusti és mtsai, 2013; Janer és Porte, 2007; Scott, 2018). Ugyanakkor a 2000-es évektől kezdve többen is igazolták, hogy a puhatestű fajok nagyon könnyen fel tudják venni ezeket a „gerinces” hormonokat a környezetből (Scott, 2018), illetve hetekig-hónapokig tudják tárolni a szervezetükben észterifikált formában (Scott, 2012). A szex szteroidok szintéziséhez szükséges koleszterin jelen van minden puhatestűben (Altelaar és mtsai, 2005; Idler és Wiseman, 1972) és ízeltlábúban (Markov és mtsai, 2017). Ennek ellenére kérdéses, hogy a szex szteroidok mindegyikét képesek-e endogén úton szintetizálni, mivel a klasszikus gerinces szteroidok bioszintetikus útjának három kulcsfontosságú lépése - koleszterin oldallánc hasítása, 17-hidroxiláció, és az aromatizáció - vagy hiányzik, vagy nagyon gyenge aktivitással fordul elő a puhatestűekben (Fodor és mtsai, 2020b; Scott, 2012). Még fontosabb, hogy azoknak az enzimeknek a génjét, amelyek az első és harmadik reakciót katalizálják a gerincesekben (lásd 2. ábra) eddig nem írták le a gerinctelenek genetikai állományában (Fodor és mtsai, 2020b; Markov és mtsai, 2017). A hormonális hatás kifejtéséhez alapvetően szükséges a szex szteroidok észlelése, ami a gerincesekben specifikus nukleáris- és membrán receptorokon keresztül történik (Fodor és mtsai, 2020b). Fókuszálva a PRG hatásának mediációjára, a gerincesekben 2 db nukleáris progeszteron receptor izoforma (nPR-A és nPR-B, ugyanaz a gén kódolja őket), 5 db membrán progeszteron receptor (mPR α , mPR β , mPR γ , mPR δ és mPR ϵ), valamint 4 db membrán-asszociált progeszteron receptor (PGRMC1, PGRMC2, neudesztin és neuferricin) található (Fodor és mtsai, 2020b). Habár a nukleáris progeszteron receptor génje nem található meg a gerinctelen fajokban (Fodor és mtsai, 2020b; Markov és mtsai, 2017), több mPR és membrán-asszociált progeszteron receptor homológot is leírtak már bennük (Ren és mtsai, 2019). A puhatestűek esetében ismert, hogy aspecifikus módon képesek ösztrogént szintetizálni tesztoszteronból a gerincesekben megtalálható katalizáló enzim homológjának hiányában is (Hallmann és mtsai, 2019). Ennek alapján azonban az is valószínűsíthető, hogy a gerinctelen fajok képesek a szex szteroid útvonal minden elemét endogén úton szintetizálni (2. ábra), noha ennek igazolására még további vizsgálatokra van szükség.



2. ábra: A szteroid szintézis útvonala a gerinctelenekben. Az 5 fő lépés (folyamatos nyilak) és az azokat katalizáló enzimek (és azoknak génjei) bizonyítottan megtalálhatók a gerinctelen fajokban. Azonban, eddig még nincs bizonyíték a koleszterin-pregnenolon átalakítást (szaggatott nyíl) katalizáló CYP11A (dőlten írva) és az aromatizációt katalizáló CYP19A (dőlten írva) gének jelenlétére a gerinctelenekben.

A PRG-ről kimutatták, hogy hatással van: az éticsiga (*Helix pomatia*) és a japán fésűkagyló (*Mizuopecten yessoensis*) ivarsejtképzésére, azaz gametogenezisére (Csaba és Bierbauer, 1979; Varaksina és mtsai, 1992); vitellogenezist, petesejt osztódást és spermatozoa aktiválódást okoz a közönséges nyolckarú polipban (*Octopus vulgaris*) (Di Cristo és mtsai, 2008; Tosti és mtsai, 2001); *in vitro* gaméta felszabadulást indukál a Szent Jakab-kagylóban (*Placoplecten magellanicus*) (Wang és mtsai, 2003); befolyásolja a termékenységet, az utódok energiaháztartását és azok korai fejlődését a nagy mocsári csigában (*Lymnaea stagnalis*) (Zrinyi és mtsai, 2017); valamint, hogy módosítja a peték ivararányát a nagy vízibolhában (*Daphnia magna*) (Kashian és Dodson, 2004). A T-nal kapcsolatosan leírták, hogy befolyásolja: a pizai fűcsiga (*Theba pisana*) ivarszerveinek fejlődését (Sakr és mtsai, 1992); egy édesvízi csiga (*Biomphalaria glabrata*) termékenységét (De Souza és mtsai, 1978); *in vitro* gaméta felszabadulást indukál a mélytengeri fésűkagylóban (*Placoplecten magellanicus*) (Wang és mtsai, 2003); valamint csökkenti a fertilitást és befolyásolja az utódok ivararányát a *D. magna*-ban (Barbosa és mtsai, 2008; Clubbs és Brook, 2007). Az E2-ről megállapították, hogy megnövekedett peterakási aktivitást okoz egy szárazföldi tüdős csigában (*Euhadra peliomphala*) (Takeda, 1980); befolyásolja a petesejtek méretét az ehető kagylóban (*Scrobicularia plana*) (Langston és mtsai, 2007); számos fehérje-szintű transzkripciósváltozást, valamint testméret és utódszám csökkenést okoz a *D. magna*-ban (Zheng és mtsai, 2020; Dietrich és mtsai, 2010; Luna és mtsai, 2015). Az E3 pedig nagy koncentrációban mortalitást eredményez az esetükben (Torres és mtsai, 2015). Megjegyzendő, hogy ezeknek a vizsgálatoknak a többsége csak egyetlen hatóanyagot alkalmazott a

laboratóriumi kezelések során, így kevés adat áll rendelkezésünkre a hormonkeverékek együttes és károsító hatásairól, különösen a környezetileg releváns (~1-10 ng L⁻¹) koncentrációk esetében.

Mindezen adatok alapján megállapítható - valószínűleg az azonosított membrán-, vagy membrán-asszociált progeszteron receptorok, esetleg nem specifikus interakciók révén (pl. más vegyületek receptorával) (Fodor és mtsai, 2020b; Scott, 2012) -, hogy például a puhatestűek érzékenyek a progesztogén szennyeződésekre. A lehetséges mögöttes sejtmolekulák megértésében segítséget nyújthat a *Lymnaea stagnalis* központi idegrendszerében is megtalálható négy kulcsmolekula: DJ-1, CREB, p38alpha és a JNK1 is. A DJ-1-ről korábban már megállapították, hogy bodorkában (*Rutilus rutilus*) a környezeti progesztogén-expozíció egyik potenciális biomarkere (Maász és mtsai, 2017). A CREB-ről ismert, hogy részt vesz különböző szex szteroid szignalizációjában (Lazennec és mtsai, 2011). A p38alpha és a JNK1 stressz-aktivált protein kinázok érintettek a különböző metabolikus és egyéb (környezeti) faktorokra (pl. hormonok) adott sejtes válaszokban (Bengal és mtsai, 2020). Továbbá, a p38alpha génexpressziójáról már korábban kimutatták, hogy az emelkedik a gerincesek központi idegrendszerében progesztogén kezelés hatására (Blackshear és mtsai, 2017).

2.6 Gerinctelen tesztállatok

2.6.1 A nagy mocsári csiga - *Lymnaea stagnalis*

A puhatestűek (*Mollusca*) – amelyek fajszámukat tekintve a második legdiverzebb állatcsoport a Földön- általában az ökológiai állapot kiváló (bio)indikátorai



3. ábra: *L. stagnalis* felnőtt egyede.

A skála 5 mm-nek felel meg.

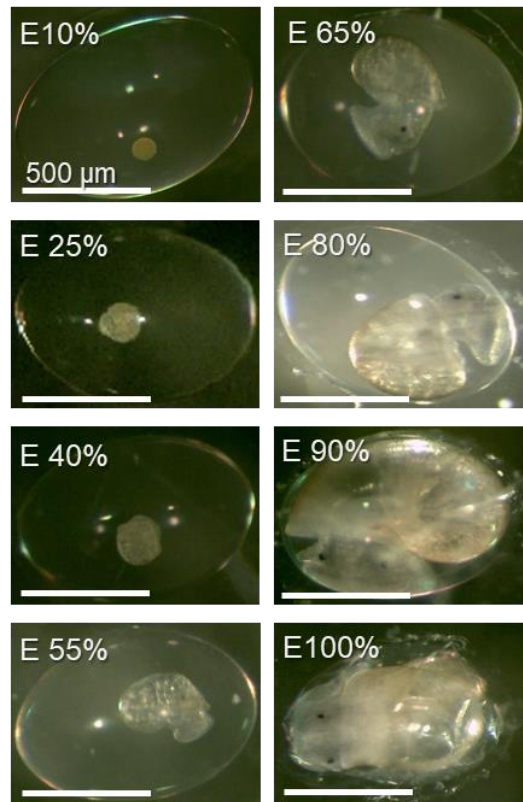
(pl. mert a legtöbb élőhelyen jelen vannak a trópusi és mérsékelt égövben, érzékenyek az antropogén szennyezésekre, stb.), ezért gyakran használják őket környezeti vizsgálatokhoz. A törzsön belül az egyik potenciális tesztállat a hermifrodita nagy mocsári csiga (*Lymnaea stagnalis*) (3. ábra), ami a csigák osztályába (Gastropoda), a tüdőcsigák rendjébe (Pulmonata), és a Lymnaeidae családba tartozó széles körben elterjedt csigafaj (Fodor és mtsai, 2020a, Benjamin 2008). Számos ökotoxikológiai vizsgálatban alkalmazták korábban (Czech és mtsai, 2001; Ketata és

mtsai, 2008; Giusti és mtsai, 2014). „Egyszerű” idegrendszerüknek köszönhetően pedig kiváló modellfajnak bizonyultak ideglettani és viselkedésökológiai vizsgálatokban is (Benjamin, 2008; Fodor és mtsai, 2020a)

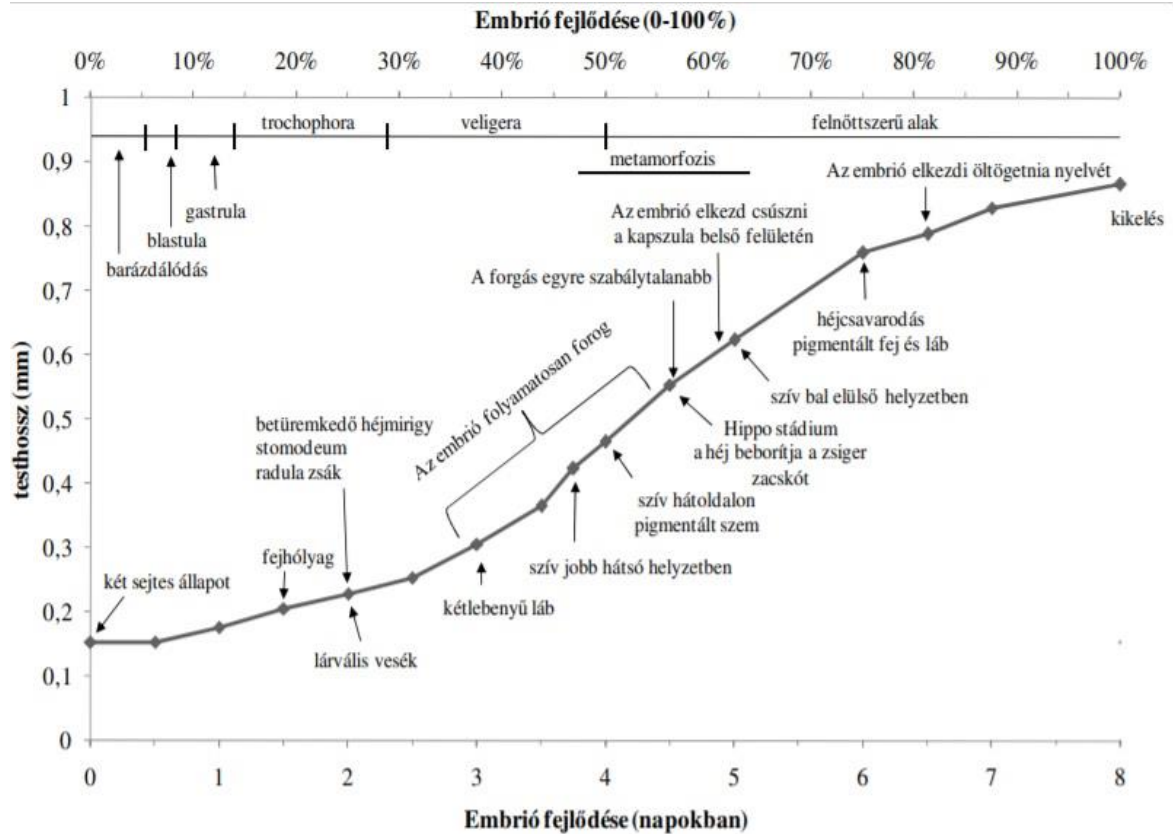
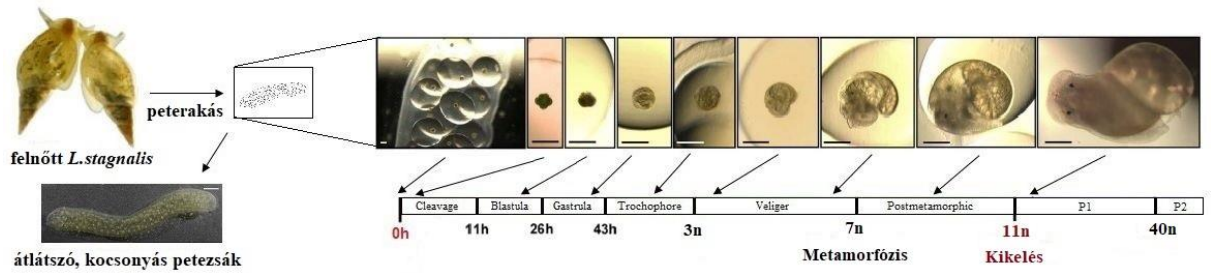
A *L. stagnalis* Észak-Amerikában, Európában, valamint Ázsia és Ausztrália egyes részein fordul elő (Atli és Grosell, 2016; Zhang és mtsai, 2018). Mégél a növényzetben gazdag álló- és lassú folyású vizekben, folyókban, tavakban, de a mesterséges tavakat és akváriumokat is jól tolerálja. Táplálékául szerves üledék, alga, de olykor foszló állati tetem is szolgálhat. Egész évben aktívak, de jellemzően tavasztól késő őszig szaporodnak (Nakadera és mtsai, 2015), a petezsákokat általában napközben rakják le (Ter Maat és mtsai, 2012). Nincs jól definiálható nappali-éjszakai ritmusuk, de alvásszerű viselkedést mutatnak (Stephenson és Lewis, 2011). A *L. stagnalis* házának hossza viszonylag nagy, 4,5 – 5,5 centiméter, szélessége 2 – 3 centiméter, és mészből épül fel. Hegyes csúcsban végződik, szarusárga színű, vékony, éppen ezért törékeny. Tapogatói sok más fajtól eltérően háromszög alakúak és oldalirányban lapítottak, az egy pár szem pedig a tövükben helyezkedik el. Az erősen oxigenizált vízben testüket kívülről borító bőrizomtömlőjükön keresztül közvetlenül is képesek felvenni az oxigént, de amikor az oldott oxigénszint csökken, átállnak a pneumostomának nevezett légzőnyíláson keresztül a „tüdős” légzésre (Lukowiak és mtsai, 1996).

A faj másik elnevezése a mételycsiga, ugyanis köztes gazdaként szolgál egyes parazitáknak, mint például laposférgeknek, amelyek olyan betegségekért felelősek, mint a *fascioliasis* (májmétegyféreg fertőzés) és a *cercarialis dermatitis* az emberek esetében (Adema és mtsai, 1994; Davison és Blaxter, 2005; Ferte' és mtsai, 2005; Núñez és mtsai, 1994; Skála és mtsai, 2020). Az itthoni csigapopuláció 80-85%-a fertőzött májmetellyel (Zrínyi, 2017). A terepi és a laboratóriumi vizsgálatok azt mutatták, hogy amennyiben a parazita bejut a csigába, akkor egy olyan krónikus fertőzést indít el, amely során a parazita megváltoztatja a csiga neurofiziológiáját, anyagcseréjét, immunitását, növekedését és szaporodását is (Kryukova és mtsai, 2014; Langeloh és Seppala", 2018; Vorontsova és mtsai, 2019).

A faj életciklusa és szaporodási biológiája részleteiben ismert (Ivashkin és mtsai, 2015; Koene, 2010; Mescheryakov, 1990; Morrill, 1982). A megtermékenyítés után utódait ún. kapszula (tojás) formájában átlátszó, kocsonyás masszába, azaz petezsákba helyezi el (átlagosan 2-3 db petezsák/hét/állat). A petezsákokat növények szárára, vagy kövekre rögzíti, a bennük lévő peték száma változó, 100 és 150 között mozog, az egyed korától, testméretétől és kondíciójától függően (Nakadera és mtsai, 2014). A petezsák átlátszóságának köszönhetően, részletesen megfigyelhetők az egyes fejlődési szakaszok a kikelésig (laborban 11-15 nap a tartási kondícióktól függően). A kapszulákban minden egyed átesik a blasztula, gasztrula, trochophora és veligera fejlődési állapotokon, majd a kikelési idő felénél a metamorfózison (Morill, 1982; Mescheriakov, 1990). Az embrionális fejlődés egyes szakaszait a teljes fejlődési idő százalékában fejezi ki a szakirodalom (4. ábra) (Marois, 1989). A faj morfológiai változásairól számos irodalmi adat áll rendelkezésünkre (pl. Raven, 1958; Morill, 1982; Mescheriakov, 1990), így a fejlődés stádiumainak beazonosításához támpontot nyújtanak az egyes szervek, vagy testrészek, illetve bizonyos embrionális viselkedési formák megjelenései, úgy mint: a forgó mozgás, a kapszulán belüli csúszó mozgás, vagy a reszelő nyelv öltögetése (fiktív táplálkozás), ami felkészülés a kikelés utáni életre (5. ábra).



4. ábra: A *L. stagnalis* egyedfejlődése. Az E0% az első barázdálódásnak, az E100% pedig a kapszulából való kikelésnek feleltethető meg.



5. ábra: A nagy mocsári csiga egyedfejlődésének módosított, sematikus ábrája (Ivashkin, 2015; Morill, 1982; Filla, 2008). A képek a nagy mocsári csiga kifejlődését mutatják be a megtermékenyítéstől kezdve a kikelésig, lentebb pedig az embrió hossz növekedése látható a fejlődés függvényében. Jól elkülöníthetőek az egyes napokon kialakuló morfológiai tulajdonságok és viselkedésbeli formák megjelenései, amelyek segítenek meghatározni a fejlődési állapotokat.

A *L. stagnalis* egyedei az ivarérettséget 2 hónap alatt érik el. Ennek pontos időpontja olyan külső környezeti tényezőktől is függ, mint a hőmérséklet, a fotoperiodicitás, az elérhető táplálék mennyisége, vagy az élőhely típusa. Egyes tanulmányok alapján az egyedek maximális várható élettartama egy év a természetben és két év a laboratóriumban (Janse és mtsai, 1988; Nakadera és mtsai, 2015), de más tanulmányok szerint több év is lehet a természetben (Berrie, 1965; Boag és Pearlstone, 1979) és 2,5 év a laboratóriumban (Watson és mtsai, 2013; Hermas és mtsai, 2014).

Mint a csigák legtöbbje, ez a faj is hímnős, szervezetében egyidejűleg jelen van mindkét nem funkcionális reprodukciós rendszere. A hím és a nőstény reprodukciót

szabályozó idegrendszeri elemek pontosan elkülönülnek az állatok központi idegrendszerében (Koene 2010). Igazoltan képes az önmegtermékenyítésre is izolált körülmények között, de elsősorban (a genetikai sokféleség megőrzése miatt) más egyedekkel párosodik. Az egyedek unilaterálisan párosodnak, azaz a párzás során az egyik egyed kizárólag hímként, a másik pedig kizárólag nőstényként viselkedik. Nincs mindenképpen felcserélődés a nemi szerepekben, de ha mindkét egyed hímként motivált, akkor a nemi szerepek felcserélődhetnek egy második kopuláció során (Fodor és mtsai, 2020a).

A *L. stagnalis* már az 1970-es évek óta a gerinctelen neurobiológia egy közkedvelt modellállata, így ideg- és neuroendokrin rendszere jól ismert a kulcsmolekuláktól egészen a már korábban említett viselkedési mintázatokat kialakító neurális hálózatok szintjéig (Benjamin, 2008; Koene, 2010; Fodor és mtsai, 2020a; Pirger és mtsai, 2021). Korábbi vizsgálatok alapján a *L. stagnalis* reprodukciós tesztjét az OECD tagországainak nemzeti koordinátorai hivatalosan is jóváhagyták, mint szabványt (OECD, 2016). Ökotoxikológiai kísérletekben betöltött jelentőségét az is alátámasztja, hogy ez a csigafaj lett az első elismert, vízi, nem ízeltlábú gerinctelen modell a környezeti kockázatértékelések során (Amorim és mtsai, 2019; Ducrot és mtsai, 2014; Giusti és mtsai, 2014; Fodor és mtsai, 2020a; Pirger és mtsai, 2018). Emellett, számos egyéb tudományterület közkedvelt modellállata is, így az *L. stagnalis*-on végzett vizsgálatok nagyon jó lehetőséget adnak arra, hogy különböző biológiai szinteket integrálva vizsgáljunk egy adott biológiai jelenséget, illetve kérdéskört.

2.6.2 Nagy vízibolha - *Daphnia magna*

A *D. magna* (6. ábra) a levéllábú rákok osztályába (Branchiopoda), ágas csápú rákok rendjébe (Cladocera) és Daphniidae családjába tartozó tesztorganizmus. A *Daphnia* nemzetség több mint 100 édesvízi plankton fajt tartalmaz, amelyek világszerte megtalálhatóak a víztestek széles skálájában. Nagyon fontos szerepet tölt be a táplálékláncban, hiszen számos tóban a halak fő táplálékforrása.

Többnyire pelagikus, azaz nyílt vízben lebegve úszó életmódot folytat. Két jól ismert és jellemzett mozgás/úszásformája van: ugrásszerű és vertikális mozgás, ami a második pár csáp le- és



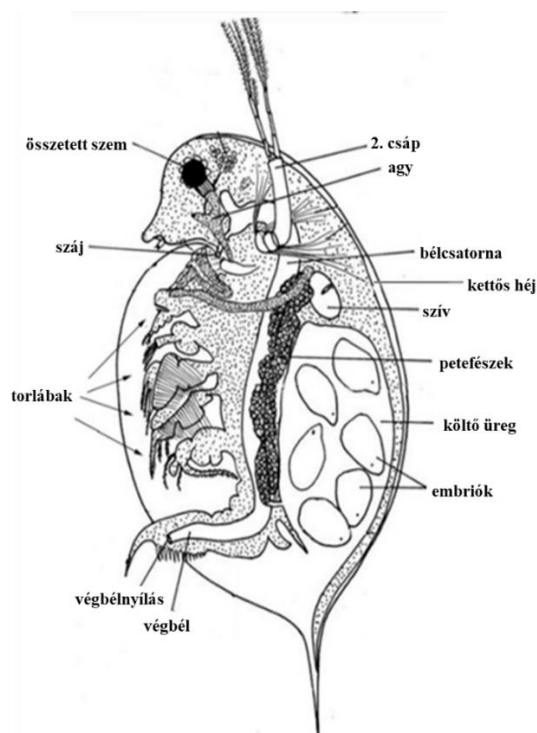
6. ábra: *D. magna*

felfelé irányuló csapkodásával valósul meg. A testük vese alakú és áttetsző, a nőstény 3-4 milliméter hosszú, a hím 1,5 milliméter csupán. Az állat törzsét két félből álló áttetsző

héj (*carapax*) borítja, melyből csak a feje nyúlik ki, és lefelé egy tüskében végződik. Több parazita (pl. *Pasteuria ramosa*, *Glugoides intestinalis*) köztes gazdájaként is ismert, amelyek befolyásolják a populáció denzitását és dinamikáját (Ebert és mtsai, 2000).

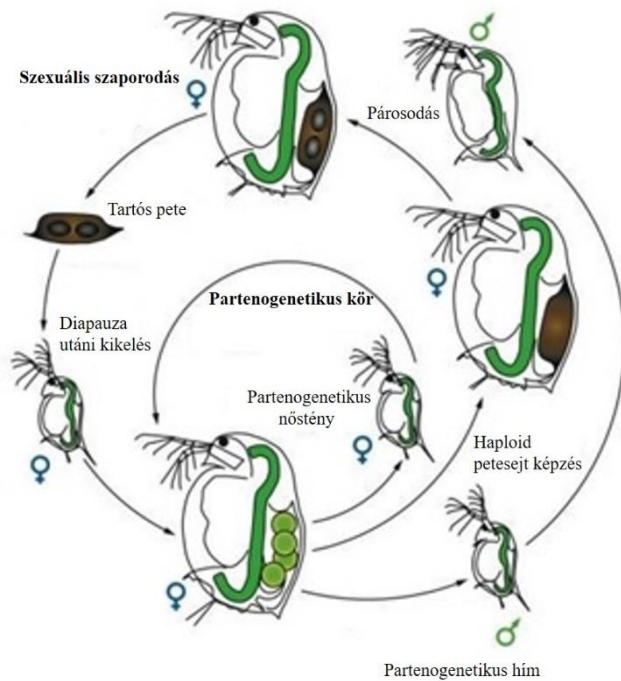
Ennek a szervezetnek számos előnye van az ökotoxikológiai tesztelés során, mint például: magas termékenység, gyors növekedés (6-8 napon belül eléri az ivarérettséget), laboratóriumi körülmények között is könnyen tartható, rövid, jól jellemezhető életciklusa van (7–8 hét, 20 °C-on), továbbá ismert genomja lehetővé teszi a molekuláris szintű vizsgálatok elvégzését is (Orsini és mtsai, 2011).

A *D. magna* nyitott vérkeringéssel rendelkezik, apró szíve (20 °C-on a szívfrekvencia átlagosan 200/perc) anterio-dorsalis elhelyezkedésű a testüregben (6. ábra). A vérszövetek könnyen azonosíthatók az átlátszó testüknek köszönhetően, amelyek gyorsan áramlanak át a testüregükön keresztül. Idegrendszerük jellemzője az agydúc (cerebrális ganglion), amely a bél és a szem közelében helyezkedik el. A fiatal és felnőtt *D. magna*-nak egy nagy összetett szeme van, míg az embrióknak kettő, amelyek a fejlődés utolsó szakaszában összeolvadnak. Ez az összetett szem segíti az állatok mozgását. Szűrőgéppel táplálkoznak, a torlábak sörtéi segítségével környezetükből algákat szűrnék ki.



6. ábra: A nőstény *D. magna* anatómiai felépítése. Forrás: <https://public.wsu.edu/~rlee/biol103/circulation.pdf> alapján

A faj nemzedékváltkozással (heterogonia) szaporodik (7. ábra). A felnőtt



7. ábra: A *D. magna* szaporodási ciklusa

egyedek minden vedlés után partenogenetikus petéket (2N) hoznak létre a hátukon lévő költőüregben (6. ábra), itt kelnek ki a petékből a juvenilis egyedek, amelyek genetikailag megegyeznek az anyával (Hebert, 1987). Az embriók fejlődése a nőstény testében mikroszkóppal, de szabad szemmel is megfigyelhető. A juvenilis egyedek átlagosan 1-2 nap után kelnek ki, de még a költőüregben fejlődnek tovább körülbelül 3 napig, majd kiszabadulnak az anyából. Az újszülöttek többnyire hasonlítanak a

felnőttekre, kivéve hogy nincs költőüregük. A fiatal állatok 4-6 jól jellemzett fejlődési stádiumon mennek át, amíg elérik az ivarérett kort (átlag 5-10 nap a tartási kondíciótól függően). Egy felnőtt egyed átlagosan 3-4 naponta hoz létre új utódokat (Ebert és Bethesda, 2005). Laboratóriumi körülmények között az egyedek körülbelül 2-3 hónapig élnek. Az aszexuális tipikus szaporodási forma mellett, úgynevezett tartós/nyugalmi petéket is képezhetnek. Ezek a költőüregben kialakuló és védelmet nyújtó, erősen melanizált (barna színű) költőtásakokban helyezkednek el (általában 2 pete/tasak). A tartós peték a *D. magna*-ban szexuális szaporodás útján képződnek, de vannak olyan ismert fajok is, amelyek aszexuális úton hozzák létre a diploid tartós petéket is. A tartós peték képzését megelőzi a haploid hímek aszexuális úton történő képzése, amelyek majd megtermékenyítik a haploid petesejteket létrehozva a tartós petéket. Ezek a szabadba kerülnek, a víz felszínén sodródhatnak, és áttelelni is képesek. A tartós peték tipikusan kedvezőtlen környezeti feltételek mellett képződnek az állatokban.

A *D. magna*-t gyakran használják tesztállatként az ökotoxikológiában (Stollewerk, 2010), különösen az édesvízi ökoszisztémák toxicitásának értékelésére (Martins és mtsai, 2007; OECD, 2012), mivel érzékeny a vízben oldódó hatóanyagokra, többek között a szteroid hormonokra is (Ten Berge, 1978; Luna és mtsai, 2015; Torres és

mtsai, 2015; Zheng és mtsai, 2020). Számos sejtes biomarkert vizsgáltak már *D. magna*-ban (Jemec és mtsai, 2007), mivel ezeket széles körben használják a környezeti szennyezések étékelésére (Nunes és mtsai, 2006; Oliveira és mtsai, 2015), illetve méregtelenítéssel kapcsolatos molekuláris (GST enzim expresszió) változások vizsgálatára. A GST enzim számos toxikus anyag (pl: gyógyszermaradványok, mikroműanyagok, rovarirtó szerek) méregtelenítésében részt vesz, és fontos szerepe van a szövetek oxidatív stressz elleni védekezésében (Yu és mtsai, 2009; Imhofe és mtsai, 2017; Mörtl és mtsai, 2020; Yoo és mtsai, 2009). Terjedelmes szakirodalom foglalkozik génexpressziós vizsgálatokkal, amelyek a toxikus anyagok organizmusokra gyakorolt hatásainak vizsgálatait tűzték ki célul (Le és mtsai, 2010; Pereira és mtsai, 2010). Ezen folyamatok felhasználhatóak a toxikus anyagok, például *D. magna*-ra gyakorolt hatásainak a megértéséhez is (Le és mtsai, 2010; Pereira és mtsai, 2010; Trac és mtsai, 2016).

3 CÉLKITŰZÉS

Az irodalmi bevezetőben felvázolt humán eredetű szennyezések ökológiai hatásának megismerése érdekében fő célunk az volt, hogy kísérletes munkáinkban megvizsgáljuk, hogy a környezetben megtalálható progesztogén típusú hatóanyagok vajon milyen szinteken és mértékben, továbbá, milyen lehetséges útvonalakon keresztül befolyásolják az OECD által is javasolt ökotoxikológiai modellszervezetek, úgymint a nagy mocsári csiga (*L. stagnalis*) és a nagy vízibolha (*D. magna*), ismert életfolyamatait. Kontrollált laboratóriumi körülmények közt - a környezeti szituációt modellezve - az állatok kezelése során a hatóanyagokat (PRG, LNG, DRO, GES) keverékben, környezeti szempontból releváns átlagos (1 és 10 ng L⁻¹) és extrém magas (100 és 500 ng L⁻¹) koncentrációkban alkalmaztunk.

A következő kérdésekre kerestük a válaszokat:

- 1) milyen progesztogén indukálta változások figyelhetők meg az egyedfejlődésben (pl. testméret) és a különböző, jól jellemzett viselkedési mintázatokban (pl. reprodukció, táplálkozás), továbbá,
- 2) milyen lehetséges sejt - és molekuláris szintű változások állhatnak a megváltozott viselkedési mintázatok hátterében?

A feltett kérdések megválaszolására az alábbi célokat tűztük ki:

- 1) Vizsgáljuk a progesztogén kezelésekre hatása a *L. stagnalis* embriók kikelésének dinamikáját, a szívfrekvencia változását, a kapszulán belüli (intrakapszuláris) mozgás intenzitását és a reszelő nyelv (*radula*) öltögetések (fiktív táplálkozás) számát
- 2) Elemezzük, hogy a *L. stagnalis* felnőtt egyedeinek jól jellemzett táplálkozási és mozgási aktivitása hogyan változik a kezelésekre hatása
- 3) Azonosítjuk a metabolikus és környezeti stressz-indukált celluláris válaszokban szerepet játszó kulcsmolekulákat (p38alpha, JNK1 és CREB) és megvizsgáljuk, hogy más ismert stresszmarkerekkel együtt (DJ-1), hogyan változik a mennyiségük 10 ng L⁻¹ hormonkezelés mellett
- 4) Nyomon követjük a progesztogén keverék hatását a *D. magna* kikelés utáni növekedésére és fertilitására valamint
- megfigyeljük, hogy a progesztogének milyen hatással vannak a *D. magna* detoxifikációs rendszerére (GST génexpresszió és aktivitás)

4 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1 Kísérleti állatok

4.1.1 *L. stagnalis*

A kísérleteinkhez 3-4 hónapos, ivarérett (fenőtt) csigákat és egy napos (<24 h) embriókat használtunk saját, parazitamentes tenyészetünkből (BLKI, Tihany). A felnőtt állatokat 20 L-es tartályokban tartottuk alacsony réz tartalmú, mesterséges vízben (só összetétel mM-ban: 0,1309 NaHCO₃, 0,0378 K₂SO₄, 0,4013 CaCl₂·2H₂O, 0,0390 Mg(NO₃)₂·6H₂O; pH=7.6) közel állandó, 20 ± 1,5 °C hőmérsékleten, folyamatos levegőztetéssel, 12 órás fény – sötét ciklusban, hetente minimum három alkalommal salátával, és heti egy alkalommal zöldségalapú haltáppal (TETRA Werke Company, Németország) etetve őket. A mesterséges vizet heti egy alkalommal cseréltük a tenyészet tartályaiban. Az állatokon végzett kísérleteket a Balatoni Limnológiai Kutatóintézetének Munkahelyi Állatjóléti Bizottsága által kidolgozott és engedélyezett eljárás szerint végeztük (VE-I-001/01890-10/2013). A kísérletekben használt állatok számának minimalizálására minden esetben törekedtünk.

4.1.2 *D. magna*

A *D. magna* kísérleteinkhez a juvenilis egyedeket (harmadik generáció) a 4 éve beállított és fenntartott tenyészetünkből használtuk. A tenyészetet az OECD (No. 211) iránymutatása alapján tartjuk fent 15 állat/500 mL szintetikus ASTM (mesterséges) vízben (összetétele mg L⁻¹-ben: 67,75 NaHCO₃; 294 CaCl₂·2H₂O; 123,3 MgSO₄·7H₂O; 5,75 KCl; pH=7.8) (ASTM, 2008), 16:8 órás fény - sötét ciklusban, 23 ± 1 °C-on, és hetente háromszor algával (*Scenedesmus obliquus* (0.5 x 10⁻⁶ sejt/mL) és haltáppal (0.9-1 mg L⁻¹, FIX1, Aqua-Life Ltd., Magyarország) etetve. A vizet hetente kétszer cseréltük a tenyészetben.

4.2 Progesztogén kezelések

A kezelések során HPLC tisztaságú, gyógyszerári hatóanyagokat – PRG (#P0130), DRO (#SML0147), GES (#L0551000) és LNG (#L0551000) – használtunk (Sigma-Aldrich, Magyarország). Ezek törzsoldatait (1 mg mL⁻¹) acetonban oldottuk fel (ACS reagens, ≥ 99,5%; CAS-szám: 67-64-1; VWR, Magyarország). Az esetleges oldószer maradványokat levegőztetéssel elpárologtattuk a vízből, így azok hatását nem kell

feltételeznünk. Ezt kísérletekkel korábban már igazolta a kutatócsoport (Svigruha és mtsai, 2020, 2021).

4.2.1 A *L. stagnalis*

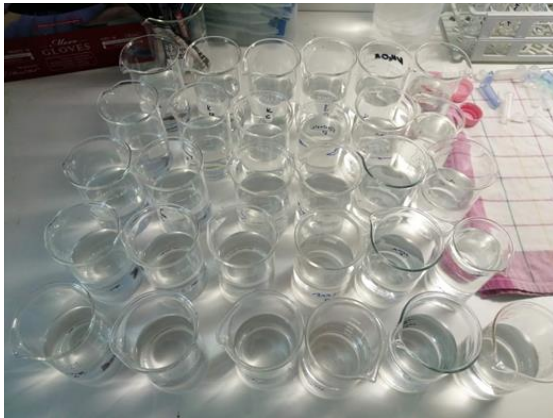
A petezsákokat saját tenyészetünkből gyűjtöttük a peterakást követő 24 órán belül, majd korábbi tanulmányokat követve (Filla és mtsai, 2009; Voronezhskaya és mtsai, 1999) izolált, egészséges (szín, konzisztencia, méret) zigótákat tartalmazó kapszulákat használtunk a fejlődés és a pigmentált szemek megjelenésének nyomon követéséhez, illetve az embrionális viselkedési változások megfigyeléséhez. Ezzel biztosítottuk a kísérletek reprodukálhatóságát. A zigótákat tartalmazó kapszulákat véletlenszerűen preparáltuk ki a petezsákból, majd 6 lyukú lemezbe (well plate) (BioLite 6 Well Multidish; #100184 Thermo Fischer Scientific) helyeztük őket (n=10 zigóta/csoport/megfigyelés). A kísérletek kontroll és kezelt csoportokból (1, 10, 100, 500 ng L⁻¹; 1 mg mL⁻¹ acetonban oldott törzsoldatból hígítva) álltak, az ismétlések száma kezelésként három volt. A kontroll csoportot 10 mL mesterséges vízben tartottuk, amely eredetileg ≤ 0,0001% oldószert (aceton) tartalmazott (az oldószer hatása nem volt kimutatható; a progesztogén expozícióval azonos közeg kialakítására törekedtünk). A kezelt csoportot PRG, LNG, GES, és DRO ekvivalens koncentrációjú keverékével kezeltük az első (E0% fejlettség) naptól kezdve egészen a kikelésig (E100%). A vizet hetente három alkalommal cseréltük a kezelések során mind a kezelt, mind a kontroll csoportokon. A kívánt kezelési koncentrációkat minden alkalommal ismételtén beállítottuk az egyes csoportok esetében.

A felnőtt csigákat a viselkedési vizsgálatok előtt 2 napig éhezettük a kellő motiváltság elérése érdekében. A kísérletekben 60 állatot teszteltünk (n=12 állat/csoport/tartály), az ismétlések száma kezelésként három volt (totál n=180 állat). A kezelt csoportokat 2 L mesterséges vízben (amely 1 mg mL⁻¹ acetonban oldott törzsoldatból hígítva 1, 10, 100 és 500 ng L⁻¹ progesztogén hormonkeveréket tartalmazott csoportonként, ekvivalens koncentrációban) tartottuk 21 napig. A kontrollcsoport állatait 2 L mesterséges vízben tartottuk a kísérlet alatt, amely eredetileg ≤ 0,000001% oldószert tartalmazott (az oldószer hatása nem volt kimutatható; a progesztogén expozícióval azonos közeg kialakítására törekedtünk). A tankok vizét hetente három alkalommal cseréltük a csoportokban a kívánt kezelési progesztogén koncentrációk fenntartása érdekében. A kívánt kezelési koncentrációkat minden alkalommal újra beállítottuk a

munkaoldatokat felhasználva. A 21 napos expozíció során az állatokat hetente háromszor etettük egyenlő mennyiségű (átlagosan 3,5 g/egyed) salátával.

4.2.2 A *D. magna*

A 21 napos progesztogén (PRG, LNG, GES, DRO) kezelésekhez (1, 10, 100 és 500 ng L⁻¹) a fiatal egyedeket (< 24 óra) egyenként helyeztük el egy-egy 150 mL-es főzőpohárba (n=6 állat/csoport) (8. ábra). Az ismétlések száma kezelésenként három volt (összesen



8. ábra: *D. magna* 21 napos progeszteron kezelése 150 mL-es főzőpoharakban

n=90 állat). A kontroll csoportba tartozó állatok vize eredetileg $\leq 0,0001\%$ oldószert tartalmazott. Az oldószert hatása nem volt megfigyelhető. Tekintettel arra, hogy a vizsgálatokhoz használt progesztogének instabillá válnak vizes oldatban (Kumar és mtsai, 2015; Ojogoro és mtsai, 2017), a vizet hetente háromszor lecseréltük, és a hormonokat újból hozzáadtuk a névleges koncentrációk eléréséhez. A 21 napos

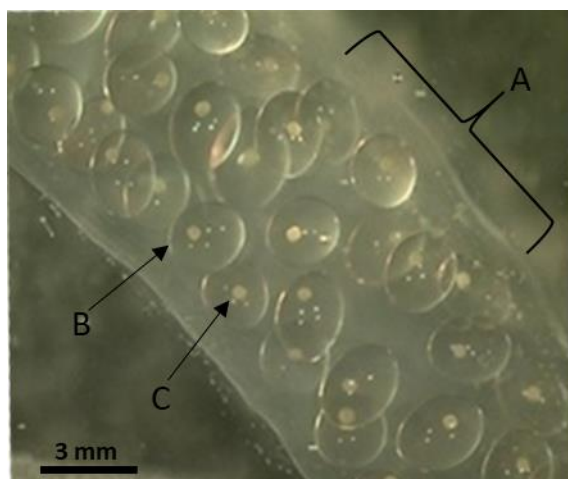
kísérlet során az állatokat hetente háromszor etettük.

A GST enzim expressziójában és aktivitásában bekövetkező változások vizsgálatához a fiatal egyedeket 500 mL-es üvegpoharakban tartottuk (n= 20 állat/csoport) és 6 napig kezeltük őket a progesztogének (PRG, LNG, GES, DRO) keverékével. Az ismétlések száma kezelésenként három volt. A kezelések előtt a fiatal egyedeket 2 órán át akklimatizáltuk mesterséges vízben.

4.3 *L. stagnalis* kísérletek

4.3.1 Embrionális fejlődés

A *L. stagnalis* embriók fejlődése egy átlátszó, kocsonyás petezsákban (9. ábra) történik körülbelül 22-25 °C-on, általában 10-15 napig (Marois és Croll, 1991). Az embrionális fejlődés morfológiai, morfometriai illetve viselkedésbeli változásait Morill (1982) és Mescheriakov (1990) megfigyelései alapján készített sematikus ábra segítségével követtük nyomon a kísérletek során (lásd 5. ábra). A kontroll illetve a kezelt embriók fejlődését az első naptól kezdve a kikelésig egy DFC3000G (Leica) digitális fényképezőgéppel felszerelt Leica M205c sztereo mikroszkóp segítségével figyeltük meg.



9. ábra: Átnézeti kép a *L. stagnalis* petezsákról (A); B – kapszula (tojás); C – megtermékenyített petesejt (zigóta)

4.3.2 Viselkedési tesztek

4.3.2.1 Embriók

Voronezhskaya (1999) és Filla (2009) megfigyelései alapján az embriók



10. ábra: Well plate kísérlet, ahol egy petezsákból származó, iker embriók szívfrekvenciáját vizsgáltuk

szívfrekvenciájának változásait, a kapszula falán történő csúszó mozgás aktivitását, illetve a reszelőnyelv öltögetések számának változásait a kontroll, illetve kezelt csoport embriói között a fejlődés E65%, E85% és E95% stádiumaiban figyeltük meg. A fentebb említett vizsgálatok közül a szívverést illetve a *radula* öltögetések számát 2 percig számoltuk (mivel ezek gyors viselkedési változásoknak tekinthetőek), a kapszulán belüli mozgásokat 4 percig követtük (lassú viselkedés) egy Leica M205c típusú sztereomikroszkóppal (10. ábra). A progesztogén kezelés által kiváltott szívfrekvencia változás megfigyelése során az egyedeket jellemző természetes variancia magas volt, amely a nagy szórások következtében elfedte a várható különbségeket. Ennek kiküszöbölésére, a szívverések számának változását a

kontrollhoz viszonyított relatív szívritmus értékekkel számoltunk OriginPro 2018 program segítségével. A *radula* öltögetések és a kapszulán belüli csúszó mozgások

változásának ábrázolásához nem volt szükség a relatív értékek számolására. Az ismétlések száma kezelésként három volt, minden viselkedési teszt esetében.

4.3.2.2 Felnőtt egyedek

Vizsgáltuk a felnőtt csigák táplálkozási és mozgási viselkedésének változásait. A táplálkozási kísérletek során a csigákat egyesével helyeztük ki 150 mL-es Petri csészékbe, a képen látható elrendezésben (11. ábra).

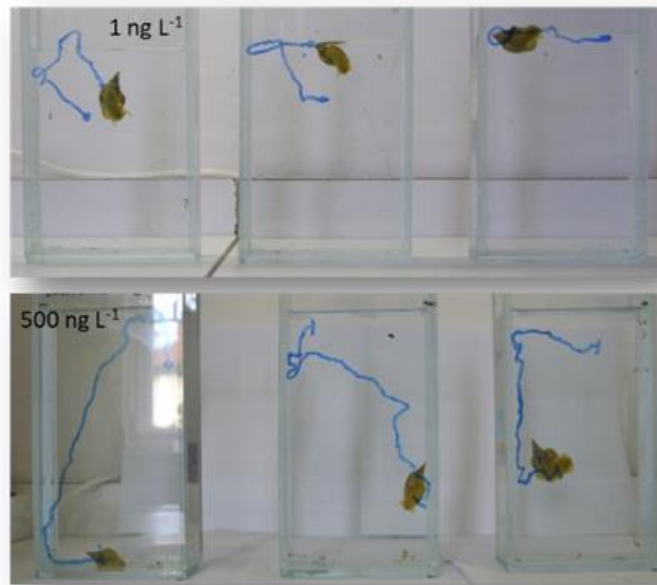


11. ábra: A táplálkozási teszt kísérleti elrendezése

A táplálkozási magatartás a reszelő nyelv, azaz a *radula* öltögetésben nyilvánul meg, mint magatartási forma, amely a 11. ábrán bemutatott kísérleti elrendezésben a tükrös rendszer segítségével nyomon követhető és detektálható (Kemenes és mtsai, 1986). A kísérlet első lépése a vízteszt, amely a spontán táplálkozási aktivitást mutatja meg. A vízteszt során 90 mL mesterséges vizet tartalmazó Petri csészékbe egyesével helyezzük ki az állatokat, majd a 10 perc akklimatizáció után 5 mL csigavizet adunk fecskendő segítségével az edényekbe. Ez után számoljuk a víz által „indukált” harapások számát 2 percig (spontán, felfedező harapások). Ezt követi a cukorteszt. A cukoroldat egy erős kémiai inger a táplálkozási magatartás kiváltásához, így ezzel az oldattal mindig, minden körülmény között képesek vagyunk táplálkozást stimulálni az egyes állatok esetében a hormonkezelések előtt és után egyaránt. Fecskendő segítségével 5 mL 20%-os cukoroldatot adunk a csigáknak, majd szintén 2 percig számoljuk a kiváltott harapások számát, mind a kontroll, mind pedig a kezelt csoportok esetében. Végül, a cukorra kapott harapások számából kivonjuk a víztesztben kapott harapások számát (háttér). A kísérleteket a progeszteron kezelés 21. napján végeztük.

A felnőtt egyedek mozgási aktivitásának vizsgálata során a kontroll illetve a progesztogén keverékkel kezelt csigákat egyenként helyeztük egy-egy kísérleti tartályba

(10 x 20 x 5 cm, (Salánki és mtsai, 2003)) a kezelések 21. napján (12. ábra). 10 perc akklimatizációt követően a kísérleti állatok által megtett útvonalat 4 percig „white board” marker segítségével jelöltük, majd a befejezés után minden esetben digitális fényképeket készítettünk a megjelölt útvonalról egy Nikon D5100 kamera segítségével. A képek alapján az egyes állatok által megtett utat Mousotron8.2 freeware szoftver segítségével, (BlackSun, www.techspot.com/download) cm-ben határoztuk meg.



12. ábra: Felnőtt csigák mozgási aktivitásának vizsgálata - jelölve 4 percen keresztül a megtett útvonalat az 1, illetve az 500 ng⁻¹L-es csoportok esetében (reprezentatív ábra).

4.3.3 Molekuláris és sejtes vizsgálatok

4.3.3.1 Nukleotid szekvenálás, bioinformatika

Nukleotid szekvenáláshoz a csigák (n=15) teljes idegrendszerét kipreparáltuk és homogenizáltuk TRI reagensben (#93289, Sigma-Aldrich) TissueLyser LT (QIAGEN) készülékkel. Az RNS-t a Direct-zol™ RNA MiniPrep kit (#R2050, Zymo Research) segítségével izoláltuk. A minták RNS tartalmát Qubit BR RNA Kit (#Q10211, ThermoFisher) használatával kvantifikáltuk, majd minőségi ellenőrzést is végeztünk Agilent Bioanalyzer 2100 készülékkel és RNA 6000 Nano Kit-el (#5067-1511, Agilent). Nanopore szekvenálási módszert használtuk az evolúciósan konzervált szignál transzdukciós molekulák azonosításához. A szekvenáláshoz szükséges könyvtárat a cDNA-PCR Kit (#SQK-PCS108, Oxford Nanopore Technologies) segítségével készítettük. A mintákat MinION készülékkel szekvenáltuk R9.4.1 típusú áramlási cella (#FLO-MIN106) segítségével. A szekvenálás során a Guppy v3.2.2 szoftverrel dolgoztunk. Releváns humán szekvenciákat (p38alpha and JNK1) az NCBI adatbázisból

(#NP_001306.1; #P45983.2) használtunk referencia szekvenciaként. Az adaptereket, illetve olyan szekvenciákat, amelyek belső adaptert tartalmaztak (kiméra 'read'), Porechop v0.2.4 (Wick és mtsai, 2018) szoftverrel távolítottuk el. A 'read'-ek összeszerelése és a konszenzus szekvenciák létrehozása a CLC Genomimcs Workbench v12.0.3 software de novo pipeline (QIAGEN) használatával valósult meg.

A kapott szekvencia eredményeket feldolgoztuk. A szekvencia korrekcióhoz a konszenzus szekvenciákat összehasonlítottuk a *L. stagnalis* előzetes genom adatokból származtatott virtuális cDNS szekvenciákkal (Illumina szekvenálással), amelyekhez konzorciumi partnerként hozzáférésünk van (a teljes genom publikáció folyamatban van). A *L. stagnalis*ban azonosított szekvenciákat (p38alpha és JNK1) feltöltöttük az NCBI nukleotid adatbázisba (#MW322711; #MW322712) majd konzervált domén keresést végeztük az NCBI CDD/SPARCLE (Marchler-Bauer és mtsai, 2017; Lu és mtsai, 2020) szoftverrel, hogy ellenőrizzük azt, hogy a kulcsrégiók valóban megtalálhatóak-e a következtetett funkcionális fehérje szekvenciákban.

4.3.3.2 DJ-1 ELISA

Kontroll (n=6) és 10 ng L⁻¹ progesztogén kezelt (n=6) csigák teljes idegrendszerét kiperaráltuk, homogenizáltuk 100 µL hígító oldatban (1% szarvasmarha szérum albumin [BSA] PBS-ben oldva, pH=7,3), centrifugáltuk (8000 g, 10 perc, 4°C) és a felülúszókból ELISA technikával (DuoSet ELISA Kit-R&D systems, RDDY8136-05) kvantitatív DJ-1 fehérje meghatározást végeztünk a gyártó által előírt protokoll szerint. A DJ-1 protein szekvenciáját kutatócsoportunk korábban már azonosította (#MT153192.1) a *L. stagnalis* központi idegrendszerében és igazolta, hogy az evolúciósan erősen konzervált (Fodor és mtsai, 2020c). A kísérletekhez használt DJ-1/PARK7 DuoSet ELISA Kit-et sikeresen alkalmaztuk korábban a célfehérje kvantitatív elemzésére a bodorkában (*Rutilus rutilus*) is (Maász és mtsai, 2017).

Első lépésben a mintahelyekre kikötöttük a DJ-1 specifikus elsődleges antitestet (#844090) 0,8 µg mL⁻¹ mennyiségben (100 µL/lemez) és inkubáltuk szobahőmérsékleten az éjszaka folyamán. A mintahelyeket a mosást követően (0.05% Tween-20 in PBS, pH 7.2-7.4) szobahőmérsékleten 1 órán át blokkoltuk (300 µL/lemez, 1% BSA in PBS, pH 7.2-7.4), majd mosás után 100 µL DJ-1 standard (#844092) hígítási sort (0,313; 0,625; 1,25; 2,5; 5 ng mL⁻¹) és 100 µL szövethomogenizátum mintát adtunk a megfelelő mintahelyekhez. 1 órán át ismételtlen inkubáltuk azokat szobahőmérsékleten. Ismételt mosás után a mintákhoz hígító oldatban 45 ng mL⁻¹ koncentrációban feloldott másodlagos

antitestet (#844091) adtunk (100 μ L/lemez), majd további 2 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk. Ezt követően hígító oldatban oldott steptavidin-HRP-t (1:40) adtunk a mintahelyekhez (100 μ L/lemez) és további 20 percet sötétben inkubáltuk őket. Az enzimreakciót 3,3',5,5'-Tetramethyl-benzidine (TMB, #T0440; Sigma Aldrich) előhívó oldattal intenzifikáltuk, majd 20 perc sötétben való előhívást követően a reakciót tömény kénsavval (2N) állítottuk le. Az immun komplex jelenlétére utaló kék szín optikai denzitását ELISA-lemez olvasóval (Victor3 1420 több csatornás számláló, PerkinElmer) mértük, 450 nm hullámhosszon. A mérést hármas paralel elrendezésben végeztük, korrekciós háttérkivonással (550 nm), végül a minták DJ-1 tartalmát szöveti koncentrációra (ng/mg szövet) számítottuk át. A metodikai kontrollokat elsődleges és másodlagos antitestet tartalmazó hígítási oldatokkal végeztük 3 ismétlésben, 2 órás inkubálással, szobahőmérsékleten.

4.3.3.3 MAPK microarray

A progesztogén kezelés MAPK útvonalakra gyakorolt lehetséges hatásainak vizsgálatát a Human Phospho-MAPK Array Kit (Biomedica Hung., Budapest, Hungary) segítségével végeztük. A kontroll (n=6) és a 10 ng L⁻¹ progesztogén keverékkel (PRG, DRO, LNG, GES) kezelt (n=6) csigák teljes idegrendszerét kipreparáltuk, és előkészítettük MAPK array-hez.

A felcseppentett antitesteket tartalmazó membránokat 1 órán át blokkoltuk a gyártó által mellékelt protokoll szerint, majd hozzáadtuk a rekonstruált másodlagos antitest koktélt, és egy éjszakán át 4 °C-on inkubáltuk azt a homogenizált mintákkal. Mosás után steptavidin-HRP-t adunk a mintaközeghez, majd a membránokat kemilumineszcens reagenssel inkubáltuk. Az immunjel kialakulása után a reakciót leállítottuk és a membránokat mostuk, majd kiértékeljük az eredményt. A kapott adatokat ImageJ szoftverrel kvantitatív elemeztük. Korábbi eredmények (Sadamoto és mtsai, 2004) és a dolgozatban azonosított szekvencia adatok alapján a *L. stagnalis*-ban, a CREB fehérje (#BAC20140.1), a p38alpha és JNK1 nagy hasonlóságot mutatott a releváns humán szekvenciákkal.

4.4 D. magna kísérletek

4.4.1 Növekedés és reprodukciós változások

A *D. magna* növekedésének és szaporodásának (peteképzés) megfigyelését LEICA M205C sztereomikroszkóppal (BioMarker Ltd, Magyarország) végeztük, majd a növekedés dinamikáját (testméret változása) LAS szoftver segítségével mértük meg (verzió: 4.12). Az állatok testméretét (heti három alkalom) az ellipszis közelítő kerületének képletével (1) határoztuk meg. Az ellipszis közelítő kerületének (K) képletében az "a" az állat anterior -poszterior, a "b" pedig az állat dorzális - ventrális tengelyét jelöli.

$$(1) K \approx 4 \frac{\pi ab + (a - b)^2}{(a + b)}$$

4.4.2 Molekuláris és sejtes vizsgálatok

4.4.2.1 A GST expressziós szintjének vizsgálata

Az RNS mintákhoz a kontroll, illetve a kezelt csoportok azonos korú 20-20 egyedét golyós-malom segítségével (TissueLyser LT, QIAGEN) TRI reagensben (#93289, Sigma-Aldrich) homogenizáltuk. Az RNS-t a Direct-zol™ RNA MiniPrep kit (#R2050, Zymo Research) alkalmazásával izoláltuk a gyártó utasításai alapján. Az RNS mennyiségeket Qubit 4.0 eszközzel (#Q33238, Thermo Fisher Scientific) és Qubit BR RNS Kit (#Q10211, Thermo Fisher Scientific) segítségével kvantifikáltuk. A 200 ng RNS standardizálást követően cDNS-t készítettük a RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (#K1631, Thermo Fisher Scientific) használatával, majd a kapott cDNS-t felhasználva kvantitatív real-time PCR-t végeztünk. Minden reakcióelegy 10 µL volt, ami 5 µL 2X PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix-et (ROX referencia festékkel) (A25741, Thermo Fisher Scientific), 3,0 µL desztillált vizet, 1 µL cDNS mintát és 1 µL primer párt (10 µM) tartalmazott, ami szelektíven amplifikálta a GST-t, vagy a β-actin-t.

Az alkalmazott primer párokat Liu és mtsai (2017) munkája alapján adoptáltuk: forward primer a GST-re: GGG AGT CTT TTA CCA CCG TTT C; reverse primer a GST-re: TCG CCA GCA TAC TTG TT; forward primer a β-actin-ra: GCC CTC TTC CAG CCC TCA TTC T; reverse primer β-actin-ra: TGG GGC AAG GGC GGT GAT TT. Minden reakcióelegyet egy 96-lyukú mikrolemezben készítettünk el, 3 ismétlést végezve. A PCR reakció kondíciói a következők voltak: 50 °C 2 percig, 95 °C 2 percig (holding stage); 40 ciklusban 95 °C 3 másodpercig, 60 °C 30 másodpercig (cycling stage)

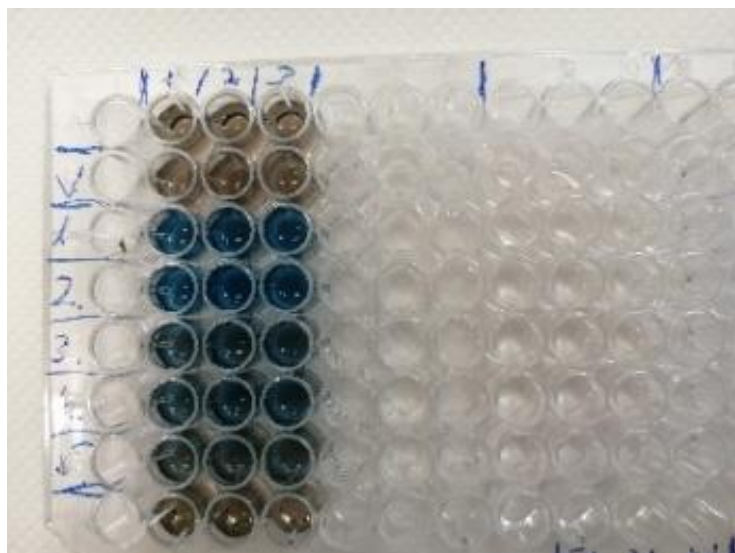
StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Life Technologies) készülék és StepOne™ (version 2.3) software használatával. A mérés végén olvadási görbe analízist végeztünk (0,3 fokként 60-95 °C között), hogy ellenőrizzük a PCR termék specifitását. A GST relatív mRNS expresszióját C_T ($\Delta\Delta C_T$) módszerrel hasonlítottuk össze a kontroll és a kezelt csoportból származó minták esetében, a β -actint mRNS expressziós szintjéhez viszonyítva (endogen kontroll, a kezelések indukált hatásától független molekula, így szintje állandó).

4.4.2.2 A teljes fehérjetartalom és a GST enzim aktivitása

A GST enzim aktivitását a teljes fehérje tartalom alapján határoztuk meg, így először megmértük az egyes minták teljes fehérje tartalmát (13. ábra). A méréshez 20-20 db azonos korú felnőtt kontroll és kezelt *D. magna* egyedét használtuk. A fagyasztott állatokat homogenizáltuk golyós-malom segítségével (TissueLyser LT, QIAGEN), 150 μ L foszfát puffer sóoldatban (PBS, pH=7,4). A homogenizátumot centrifugáltuk (8000 g 10 percig, 4 ° C-on), majd 20-20 μ L felülúszót használtunk fel a biokémiai mérésekhez. Csoportonként 20 μ L felülúszóhoz 240 μ L Bradford-reagenst (#B6916, Sigma-Aldrich) pipettáztunk, ezzel határoztuk meg az össz-fehérje tartalmat színreakció alapján. A GST-aktivitásokat GST Assay Kit-el (#CS0410, Sigma-Aldrich) mértük, majd a kapott eredményekből a (2) egyenlet alapján számítottuk ki azokat. A 8,5 perces sötétben történő inkubáció után, a kialakult színreakciót 340 nm hullámhosszon Victor III. (Perkin Elmer) plate olvasó segítségével mértük meg. A kapott abszorbancia értékekből ismert fehérjekoncentráció alapján elkészített kalibrációs egyenes segítségével határoztuk meg a fehérje tartalmat (nmol/mg/perc). Az enzim aktivitásának mérésekor 20 μ L felülúszóhoz 180 μ L puffert pipettáztunk. A puffer összetétele: CDNB festék (100 mM) 100 μ L, L-glutation reduced (200 mM) 100 μ L és GST puffer (pH=6,6) 9,8 mL. Az ismétlések száma három volt.

$$(2) \text{ GST aktivitás} = \frac{(\Delta\text{Abs}_{340}) \times V_{\text{total}}}{\Delta t \times l \times \epsilon \times V_{\text{minta}} \times [\text{fehérje}]}$$

ahol „ ΔAbs_{340} ” abszorbancia változása 340 nm-es hullámhosszon, „V” térfogat, „ ϵ ” az extinkciós együttható, „l” az olvasási magasság a cellában.



13. ábra: Teljes fehérje meghatározása Bradford-reagenssel 96-lyukú platen

4.5. Statisztikai vizsgálatok

A *L. stagnalis* kísérletek statisztikai elemzéseit az OriginPro 2018 (OriginLab Corp., Northampton, Massachusetts, USA) szoftver segítségével végeztük el. Az adatok normalitását Shapiro-Wilk teszt alkalmazásával, a varianciák homogenitását pedig Levene statisztikával vizsgáltuk. Az embriók kikelésének dinamikájához, a pulzusszámukhoz és a táplálkozási aktivitásukhoz két-utas ismételt ANOVA-t alkalmaztunk, hogy vizsgáljuk a kezelési idő, a koncentrációk és azok interakcióinak hatását. Ezt az elemzést egy-utas ANOVA és Scheffe post-hoc teszt követte, hogy azonosítani tudjuk a kontroll és a kezelési csoportok közötti statisztikailag szignifikáns különbségeket egy adott időpontban. Az embriók kapszulán belüli mozgásának vizsgálatához, illetve a felnőtt egyedek táplálkozási és mozgási aktivitásának változásához szintén egy-utas ANOVA-t és Scheffe post-hoc tesztet végeztünk a kontroll és a kezelt csoportok között. A különbségeket statisztikailag szignifikánsnak tekintettük $P < 0,05$ (*), $P < 0,01$ (**) és $P < 0,001$ (***) esetén. Az ábrákon található hibásávok az átlag \pm szórást jelzik. A celluláris proteinek mennyiségi különbségeit kétmintás t-teszt segítségével elemeztük.

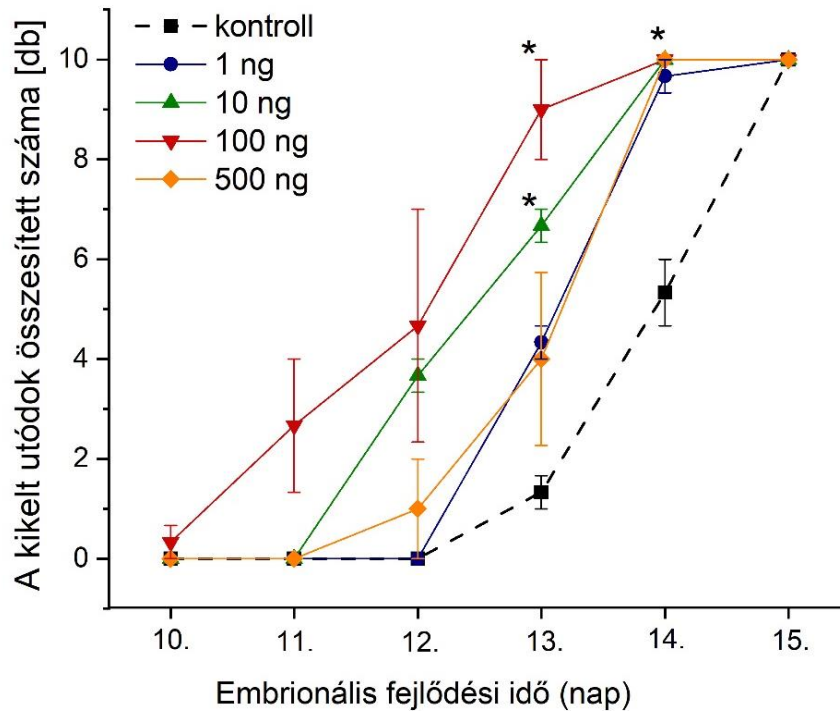
A *D. magna* kísérletek statisztikai elemzéseikhez szintén az OriginPro 2018 szoftvert használtuk. Az adatok normalitását Shapiro-Wilk teszt alkalmazásával, a varianciák homogenitását pedig Levene statisztikájával vizsgáltuk. Az egyedek testméretének növekedéséhez két-utas ismételt ANOVA-t alkalmaztunk, hogy vizsgáljuk a kezelési idő, a koncentrációk és azok interakcióinak hatását.

Ezt az elemzést egy-utas ANOVA és Scheffe post-hoc teszt követte, hogy azonosítani tudjuk a kontroll és a kezelési csoportok közötti statisztikailag szignifikáns különbségeket egy adott időpontban. A reprodukció (egy egyedre jutó maximális peteszám) esetében a Levene teszt a varianciák inhomogenitását mutatta, ezért a nem parametrikus Kruskal-Wallis tesztet alkalmaztuk Dunn post hoc teszttel. Az enzimaktivitás adatait egy-utas ANOVA-val elemeztük Scheffe post-hoc tesztet alkalmazva. Az expressziós adatokat logaritmizáltuk és egy-utas ANOVA-val elemeztük Scheffe post-hoc teszttel. A különbségeket statisztikailag szignifikánsnak tekintettük $P < 0,05$ (*) és $P < 0,01$ (**) esetében. Az ábrákon található hibaszívek az átlag \pm szórást jelzik.

5 EREDMÉNYEK

5.1. A kezelések hatása a csigaembriók fejlődésére

A teljes kezelés (15 nap) alatt egyetlen alkalmazott progesztogén-koncentrációnál sem tapasztaltunk mortalitást. A krónikus progesztogén kezelések *L. stagnalis* embrionális fejlődésére gyakorolt hatásának eredményeit az 14. ábrán, a 10. embrionális naptól kezdve mutatjuk be.

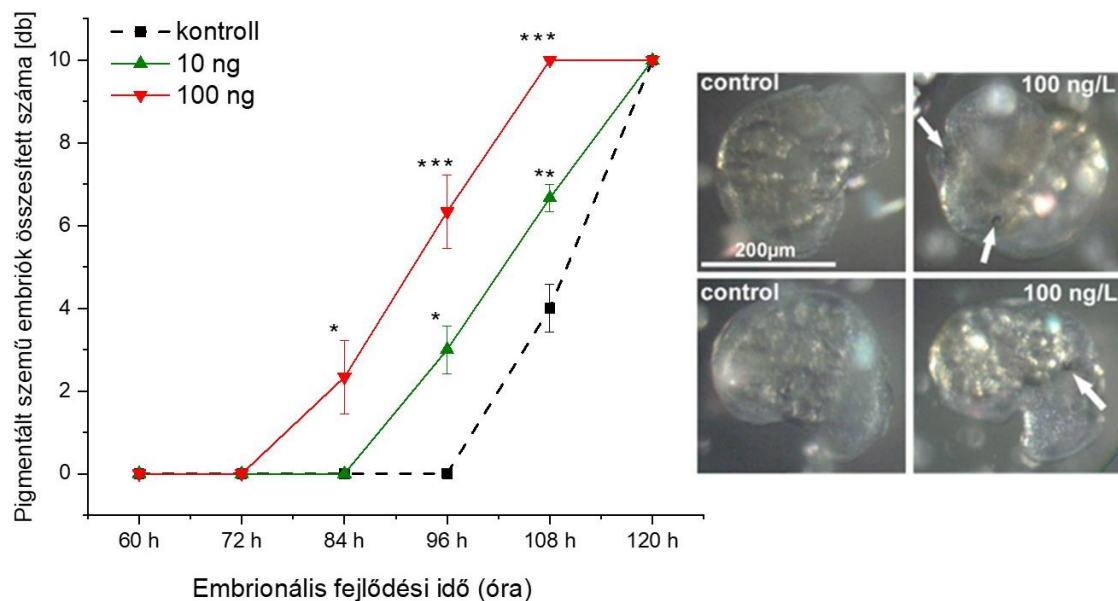


14. ábra: *L. stagnalis* embriók kikelésének dinamikája a progesztogén kezelések során. A fekete szaggatott vonal jelzi a kontroll csoportot, kék színnel az 1 ng L⁻¹; zöld színnel a 10 ng L⁻¹; piros színnel a 100 ng L⁻¹; narancssárga színnel pedig az 500 ng L⁻¹-es csoportot jelöltük. *- a kontroll és a kezelt csoportok közötti szignifikáns eltéréseket jelöli P < 0,05 szignifikancia szinten vizsgálva. Az ábrákon található hibaszávok az adatsorok szórását mutatják.

A progesztogén expozíció valamint az embrionális fejlődés ideje is befolyásolta a kikelt utódok összesített számát, változást okozott az embriók kikelésében a kontroll csoporthoz képest. A két-utas ismételt ANOVA mérések szignifikáns hatást mutattak az idő (megfigyelési nap) [F(5, 60) = 209,49, P < 0,0001], a kezelés [F(4, 60) = 20,92, P < 0,0001] és az idő-kezelés interakciójának elemzése esetében is [F(20, 60) = 4,26, P < 0,0001]. A további, adott megfigyelési napokra elvégzett egy-utas ANOVA és a Scheffe post-hoc teszt alapján elmondható, hogy az első három megfigyelési napon (10-12.) nem találtunk szignifikáns különbséget a kontroll és kezelt csoportok között. A 13. napon, a kikelés dinamikája szignifikánsan nőtt a 10 és 100 ng L⁻¹-es kezelt csoportokban [F(4,

10)= 3,58, $P < 0,05$]. A 14. napra a legtöbb embrió már kikelt a kezelések hatására (1 ng L^{-1} : 9/10; 10 ng L^{-1} : 10/10; 100 ng L^{-1} : 10/10; 500 ng L^{-1} : 10/10), szignifikáns növekedést [$F(4, 10)=9,70$, $P < 0,05$] mutatva a kontroll csoporttal szemben (átlagosan 5/10). A kontroll csoport összes egyede a 15. napra kelt ki.

A kikelés dinamikáján kívül megfigyeltük (5 napon keresztül) a hólyagszem pigmentációjának megjelenését a 10 és a 100 ng L^{-1} -es kezelt csoport egyedeiben, a kontroll csoporthoz képest (15. ábra).



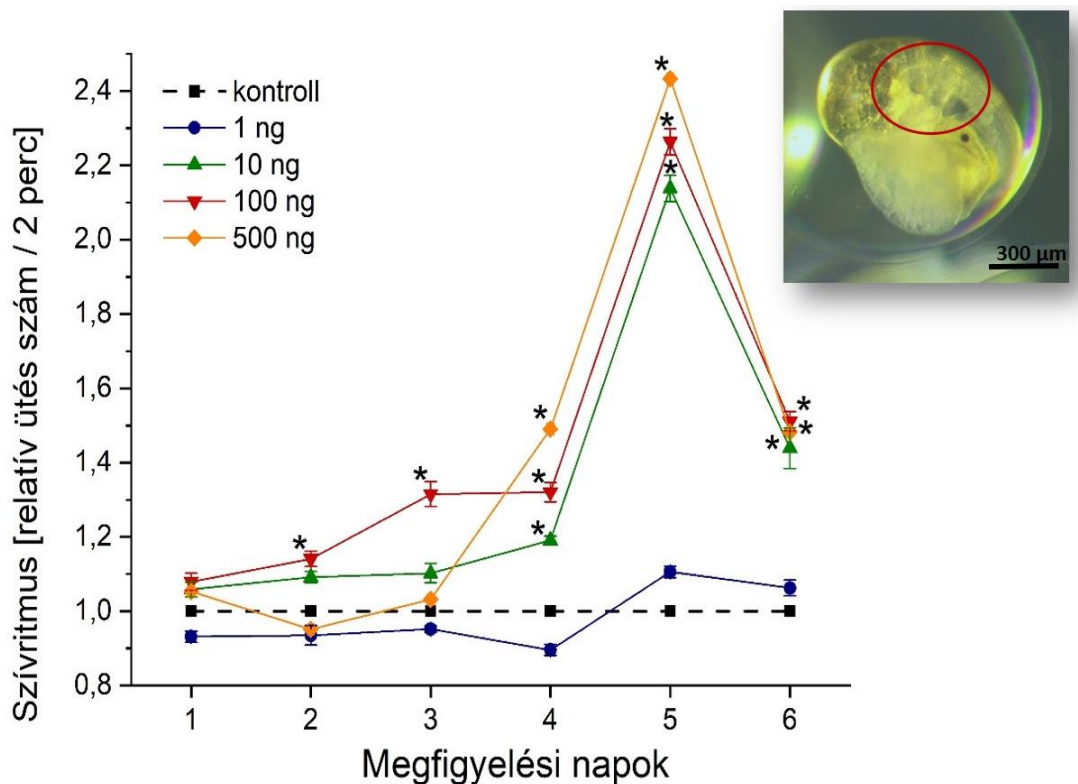
15. ábra: A hólyagszem megjelenésének időbeli lefutása a fejlődés során a kontroll (fekete), 10 (zöld) és 100 ng L^{-1} (piros) progesztogén (PRG, LNG, GES, DRO) hormon keverékkel kezelt csoportok esetében. A fotókon azonos fejlődési napon láthatók a kontroll és a 100 ng L^{-1} csoportokból véletlenszerűen válogatott ikerembriók. A fehér nyilak a feketésen pigmentált hólyagszemet jelölik az embrióban.

A progesztogén expozíció valamint az embrionális fejlődés ideje is befolyásolta a hólyagszem megjelenését. A két-utas ismételt ANOVA mérések szignifikáns hatást mutattak az idő (megfigyelési nap) [$F(5, 177) = 52,02$, $P < 0,001$], a kezelés [$F(2, 177) = 16,37$, $P < 0,001$] és az idő-kezelés interakciójának elemzése esetében is [$F(10, 177) = 2,67$, $P < 0,01$]. A további, adott megfigyelési időre elvégzett egy-utas ANOVA és a Scheffe post-hoc teszt alapján elmondható, hogy a 100 ng L^{-1} -es csoport egyedeiben már a 84. órában megjelennek a hólyagszemek a kontroll csoporthoz képest ($P < 0,05$). A 96. órától a 10 ng L^{-1} -es csoport egyedeiben is megjelennek a szemek a 100 ng L^{-1} -es csoport továbbra is szignifikáns különbséget mutat [$F(2, 6)=27,1$ $P < 0,05$ és $P < 0,001$]. A 108.

órában a szignifikáns különbség még mindig fennáll a kezelt csoportok egyedei és a kontroll egyedei között [F(2, 6)=61 P <0,01 és P <0,001).

5.2 Az embrionális viselkedési formákban megfigyelt változások

A kezelések hatására kialakuló szívfrekvencia változását, amit E65-75%-os fejlettségű embriókban néztünk, az 16. ábra szemlélteti. A két-utas ismételt ANOVA mérések szignifikáns hatást mutattak az idő (megfigyelési nap) [F(5, 444) = 155,54, P <0,05], a kezelés [F(4, 444) = 81,02, P <0,05] és az idő-kezelés interakciójának elemzése esetében [F(20, 444) = 11,67, P <0,05] is.

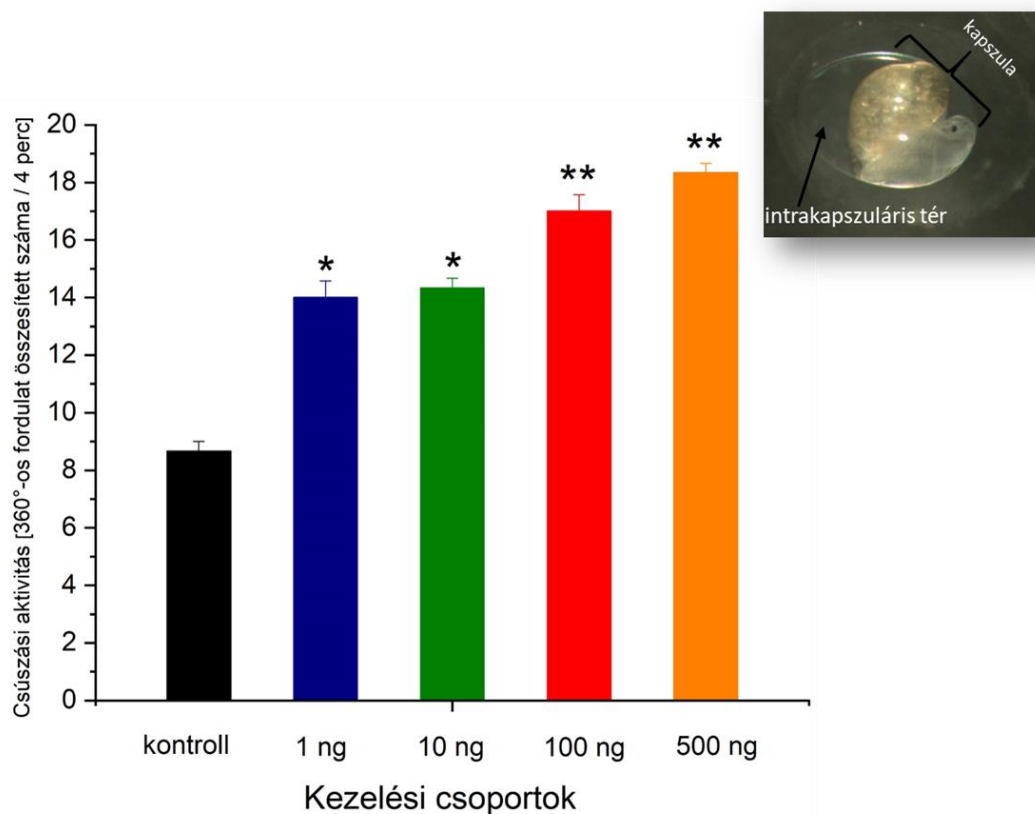


16. ábra: Az embriók relatív pulzusszáma a 6. fejlődési naptól (1 megfigyelési nap) kezdődően. A fekete szaggatott vonal a kontroll csoportot jelzi (önmagára standardizálva, $y = 1$), míg a) progesztogén hormonkeverékkel kezelt csoportok relatív pulzus száma az eredeti kontroll értékekre lett standardizálva. Kék színnel az 1 ng L⁻¹; zöld színnel a 10 ng L⁻¹; piros színnel a 100 ng L⁻¹; narancssárga színnel pedig az 500 ng L⁻¹-es csoportot jelöltük. *- a kontroll és a kezelt csoportok közötti szignifikáns eltéréseket jelöli P <0,05 szignifikancia szinten vizsgálva. Az ábrákon található hibaszávok az adatsorok szórását jelzik. Az embrióról készült beszűrt fotón a piros kör a szívet jelöli a háti oldal jobb oldalán.

A további, adott megfigyelési napokra elvégzett egy-utas ANOVA és a Scheffe post-hoc teszt eredményei azt mutatták, hogy nem volt szignifikáns különbség a szívritmus változásában a kontroll és az 1 ng L⁻¹-es csoportok között. A 100 ng L⁻¹-es progesztogénnel kezelt csoport embriói szignifikánsan magasabb pulzusszámot mutattak

a 2. [F(4, 71)=10,89] és a 3. [F(4, 71)=40,28, P <0,05) megfigyelési napokon. A 4. [F(4, 71)=27,09, P <0,05] és 5. [F(4, 71)=37, 50, P <0,05] megfigyelési napokon a 10, 100 és 500 ng L⁻¹ -es kezelt csoport embrióinak pulzusa szignifikánsan nőtt, 2,1; 2,2 és 2,4-szeres maximális, relatív változásokat mutatva. A fejlődés előrehaladtával, a kikelés előtt (6. megfigyelési nap) ez a szignifikánsan [F(4, 71)=10,68, P <0,05) felgyorsult szívfrekvencia a kezelt csoportokban már csak 1,5-ször volt magasabb a kontroll egyedekben mérhető standard értékeknél.

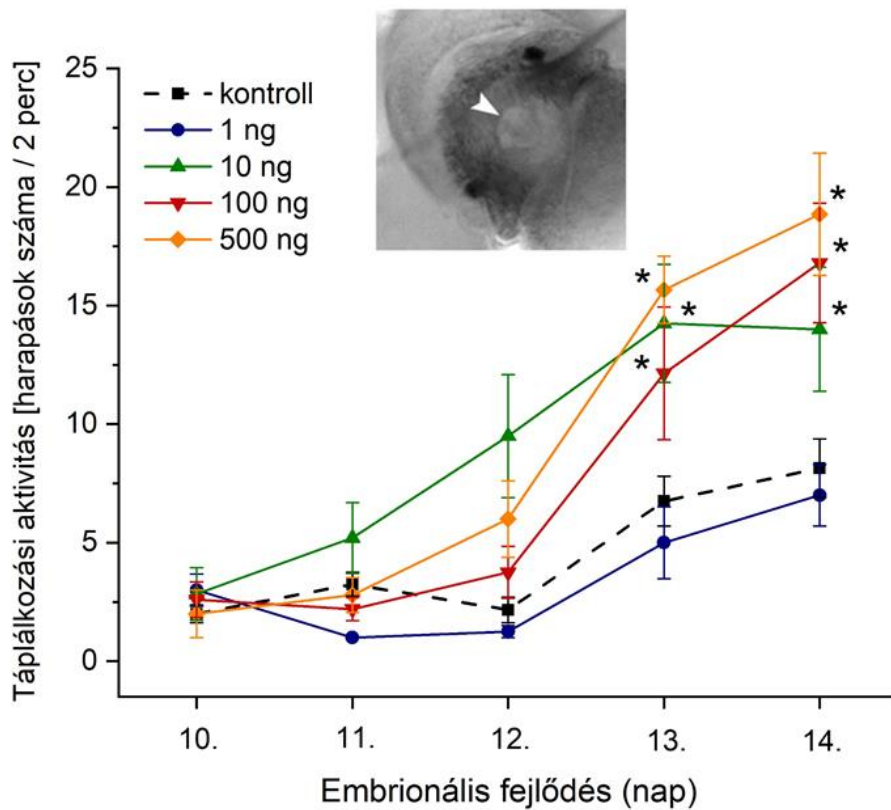
Az embrió körülbelül E80%-os fejlettségi állapottól kezdve már a felnőttekhez hasonló mozgásformát mutat és a kapszula belső falán, a talpán elhelyezkedő csillók segítségével „csúszkál” (Voronezhskaya és mtsai, 1999). Az intrakapszuláris mozgást 3 napig követtük nyomon, az embrionális fejlődés E80% - E90% közötti szakaszában (17. ábra).



17. ábra: Az embriók intrakapszuláris térben megfigyelt mozgási aktivitása. Az oszlopdiagramok a kontroll, illetve különböző koncentrációjú progesztogén hormonkeverékkel kezelt csoportok (fekete oszlop – kontroll, kék oszlop - 1 ng L⁻¹, zöld oszlop - 10 ng L⁻¹, piros oszlop - 100 ng L⁻¹, narancssárga oszlop - 500 ng L⁻¹) embriói által 4 perc alatt megtett út hosszát mutatják a kapszula belső falán megtett 360°-os teljes fordulatok (körkörös csúszó mozgások) összesített számában kifejezve. *- a kontroll és a kezelt csoportok közötti szignifikáns eltéréseket jelöli P <0,05 és ** P <0,01 szignifikancia szinten vizsgálva. Az ábrákon található hibasávok az adatsorok szórását jelzik (10 embrió / csoport / ismétlés).

Az egy-utas ANOVA [$F(4, 10) = 69,05$; $P < 0,05$] és post-hoc teszt eredményei azt mutatták, hogy ebben az időszakban az embriók intrakapszulláris térben vizsgált csúszó mozgásának kumulatív száma az 1 ($14,00 \pm 0,58$; $P < 0,05$), 10 ($14,33 \pm 0,33$; $P < 0,05$), 100 ($17,00 \pm 0,57$; $P < 0,01$) és 500 ($18,33 \pm 0,33$; $P < 0,01$) ng L^{-1} -es kezelt csoportokban szignifikánsan nőtt a kontrollhoz ($8,66 \pm 0,33$) viszonyítva.

Az embriók E95%-os fejlődési stádiumban ritmikusan kiöltik, majd visszahúzzák a reszelőnyelvüket (*radula*). Ez a viselkedésforma is hasonlít már a felnőtt állat táplálkozási viselkedéséhez (Voronezhskaya és mtsai, 1999), vagyis az embrió már a kikelés előtt felkészül a kapszulán kívüli életre. Az embriók fiktív táplálkozásának változását (*radula* öltögetések száma) a 10. embrionális naptól kezdve követtük, amit 18. ábra szemléltet.

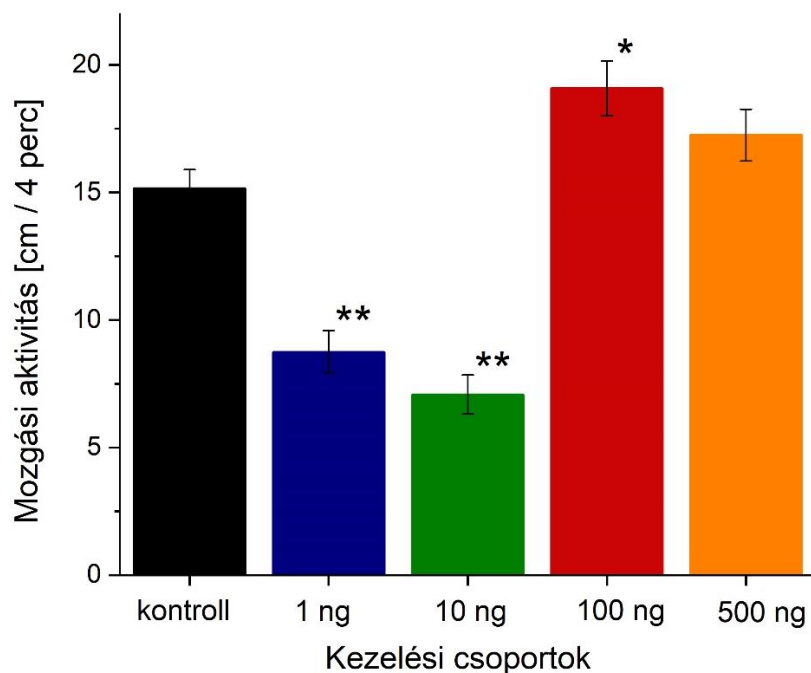


18. ábra: Az embriók táplálkozási aktivitásának változásai a kikelés előtti napokban. Az ábrán a *radula* öltögetések száma látható 2 perces időintervallumban számolva a kontroll és a különböző koncentrációjú progesztogén hormonkeverékekkel kezelt csoportokban (fekete szaggatott vonal – kontroll, kék - 1 ng L^{-1} , zöld - 10 ng L^{-1} , piros - 100 ng L^{-1} , narancssárga - 500 ng L^{-1}). *- a kontroll és a kezelt csoportok közötti szignifikáns eltéréseket jelöli $P < 0,05$ szignifikancia szinten vizsgálva. Az ábrákon található hibaszávok az adatsorok szórását jelzik (10 embrió / lemez / ismétlés). A beszúrt fotón a fehér nyílhegy a szájnyílást jelöli a pofa alsó részén a két feketén pigmentált hólyagszem között.

A két-utas ismételt ANOVA mérések szignifikáns eltéréseket mutattak az idő (embrionális fejlődési nap) [F(5, 115) = 18,17; P <0,05] és a kezelés [F(4, 115) = 3,78; P <0,05] esetében, de nem eredményezett szignifikáns hatást az idő-kezelés interakciójának elemzése [F(20, 115) = 1,03; P >0,05]. A további egy-utas ANOVA és a post-hoc tesztek azt mutatták, hogy a kontroll és az 1 ng L⁻¹ progesztogénnel kezelt csoport között nem volt szignifikáns különbség a teljes megfigyelési időszak alatt. Az első három megfigyelési napon, a statisztikai tesztek alapján nem figyeltünk meg szignifikáns különbségeket a kontroll és a 10, 100 és 500 ng L⁻¹ kezelt csoportok között sem. Ugyanakkor a 13. [F(4, 27)=3,93, P <0,05] és 14. [F(4, 29)=6,23, P <0,05] embrionális napokon a *radula* öltögetések száma szignifikánsan megnövekedett a 10, 100 és 500 ng L⁻¹-es csoportokban egyaránt.

5.3 A felnőtt csigák mozgási és táplálkozási aktivitása

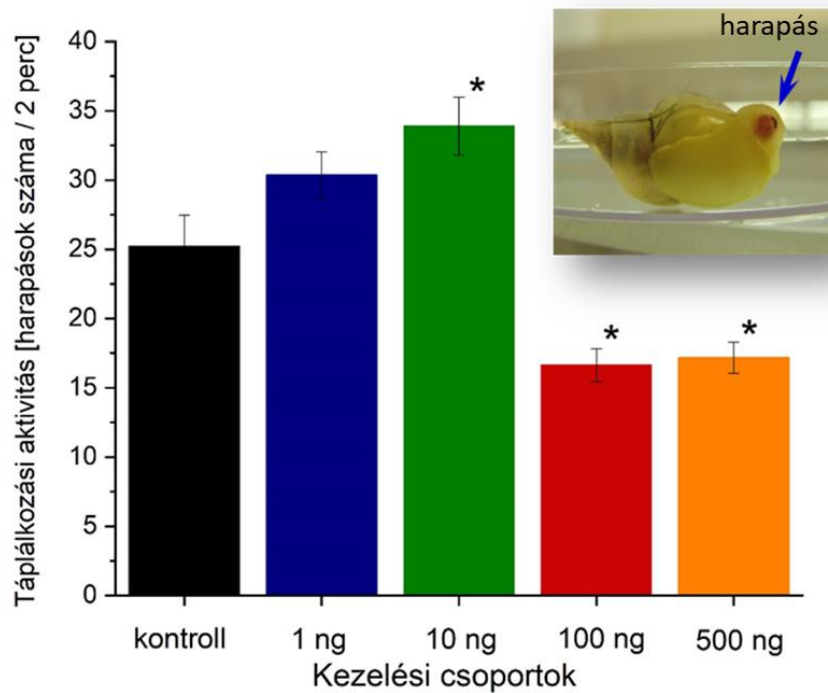
Megfigyeléseink alapján, a krónikus progesztogén kezelések jelentős változásokat indukáltak az embriókhoz hasonlóan a felnőtt csigák esetében is. A mozgási aktivitások változását a 19. ábra mutatja.



19. ábra: A felnőtt csigák mozgási aktivitásának megváltozása a progesztogén kezelések hatására. Az oszlopdiagramok a csigák által megtett átlagos út hosszát szemléltetik centiméterben, 4 perces megfigyelési időszak alatt a különböző koncentrációjú kezelési csoportokban (fekete oszlop - kontroll, kék oszlop - 1 ng L⁻¹, zöld oszlop - 10 ng L⁻¹, piros oszlop - 100 ng L⁻¹, narancssárga oszlop - 500 ng L⁻¹). *- a kontroll és a kezelt csoportok közötti szignifikáns eltéréseket jelöli P <0,05 és ** P <0,01 szignifikancia szinten vizsgálva. Az ábrákon található hibasávok az adatsorok szórását jelzik (12 felnőtt / csoport / tartály / ismétlés).

Az egy-utas ANOVA [$F(4, 55) = 34,92$; $P < 0,05$] és post-hoc teszt eredményei azt mutatták, hogy az 1, illetve 10 ng L⁻¹ kezelt csoport egyedei átlagosan rövidebb távolságot tettek meg ($8,75 \pm 0,84$, illetve $7,08 \pm 0,76$ cm, $P < 0,01$), mint a kontroll csoport egyedei ($15,16 \pm 0,74$ cm), amely a mozgási aktivitás szignifikáns csökkenését jelentette a megtett út hossza alapján. Ezzel szemben a mozgási aktivitás szignifikáns növekedést mutatott a 100 ng L⁻¹ kezelt csoportokban ($19,08 \pm 1,06$ cm, $P < 0,05$) a kontroll csoport mért értékeihez képest, ugyanakkor az 500 ng L⁻¹ csoport mozgási aktivitása ($17,25 \pm 1,01$ cm) nem mutatott szignifikáns különbséget.

A táplálkozási aktivitás, azaz a cukorral kiváltott ritmikus *radula* öltögetések (harapások) száma szintén változott a hormonkezelések során. Ennek eredményeit mutatja be a 20. ábra.



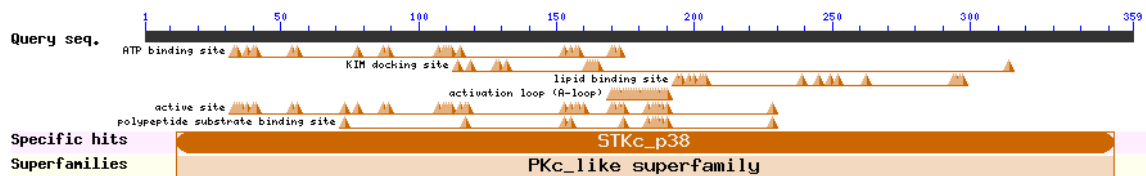
20. ábra: Táplálkozási aktivitás változása felnőtt csigákban a különböző koncentrációjú progesztogén kezelések hatására. Az ábrán a 2 percig számolt átlagos harapások számát tüntetjük fel. A fekete oszlop a kontroll csoportot, a kék oszlop az 1 ng L⁻¹, a zöld oszlop a 10 ng L⁻¹, a piros oszlop a 100 ng L⁻¹, a narancssárga oszlop pedig az 500 ng L⁻¹-es kezelt csoportot jelöli. *- a kontroll és a kezelt csoportok közötti szignifikáns eltéréseket jelöli $P < 0,05$ szignifikancia szinten vizsgálva. Az ábrákon található hibaszívek az adatsorok szórását jelzik (12 felnőtt / csoport / tartály / ismétlés). A beszúrt ábrán egy felnőtt egyed nyitott szájnyílásán keresztül kiöltött radulát jelöl a kék nyíl a táplálkozási magatartás során.

Az egy-utas ANOVA [$F(4, 49) = 23,08$; $P < 0,05$] és post-hoc teszt eredményei azt mutatták, hogy a kontroll csoporthoz képest ($25,22 \pm 2,25$ harapásszám) az 1 ng L⁻¹ csoportban látszólag megnövekedett az átlagos harapások száma ($30,36 \pm 1,67$, $P > 0,05$),

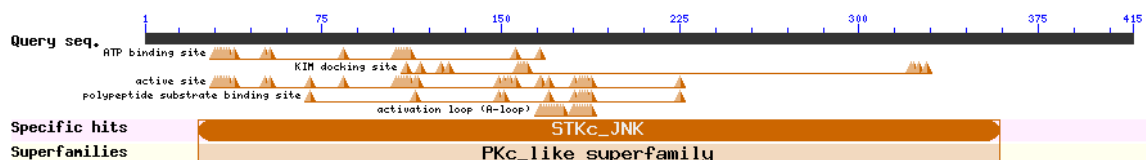
de ez nem volt szignifikáns eltérés. Ugyanakkor látható, hogy a 10 ng L⁻¹ progesztogénnel kezelt felnőtt állatok esetében már szignifikáns volt az eltérés (33,88 ± 2,10, P <0,05). A 100 és 500 ng L⁻¹ csoport egyedeinél pedig ugyanez szignifikánsan csökkent (16,61 ± 1,19 és 17,16 ± 1,14 harapásszám, P <0,05) a kontroll csoporthoz képest. Ezek a változások ellentétes irányúak a mozgási aktivitás esetében tett megfigyelésekkel. Megállapításaink szerint a progesztogén kezelések nemcsak az embriókra, hanem a felnőtt egyedekre is hatnak.

5.4. Azonosított stressz-aktivált protein kinázok

A *L. stagnalis* központi idegrendszerének neuronjaiban található transzkriptek szekvenálása után sikeresen azonosítottuk a p38alpha és a JNK-1 stressz-aktivált proteinek kódoló régióját (Függelék 2. ábra). A p38alpha kódoló régiója 3760 bp hosszú, a prediktált fehérje pedig 358 aminosav (21. ábra), míg a JNK-1 kódoló régiója 2448 bp, a prediktált fehérje 414 aminosav hosszú (22. ábra). Mindkét fehérje szekvencia esetében azonosítani tudtuk a rá jellemző konzervált domént is (SKTc_38 és SKTc_JNK).



21. ábra: p38alpha kódoló régiója

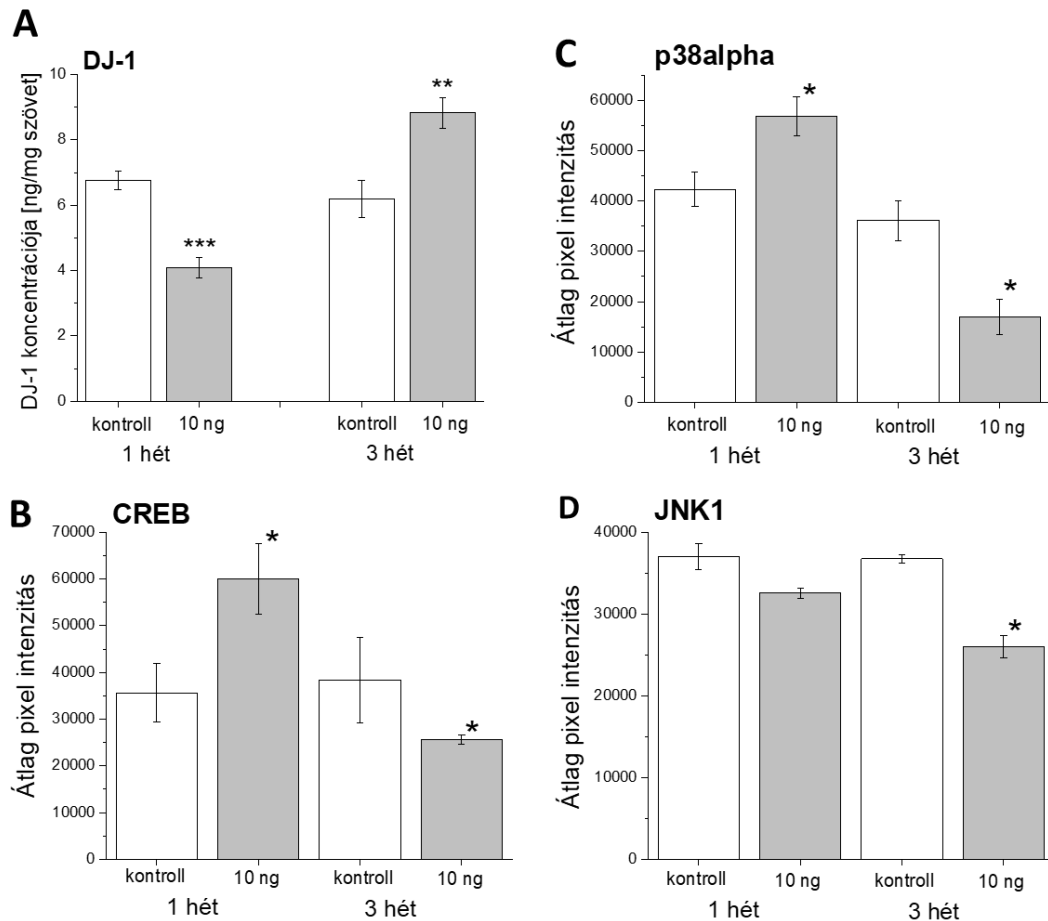


22. ábra: JNK-1 kódoló régiója

5.5. Celluláris változások a központi idegrendszerben

Miután azonosítottuk a metabolikus és környezeti stressz-indukált celluláris válaszokban szerepet játszó kulcsmolekulákat (p38alpha és JNK1), megvizsgáltuk, hogy más ismert stresszmarkerekkel együtt (pl. DJ-1), hogyan változott a mennyiségük a hormonkezelések hatására. Méréseink alapján (23. ábra) a DJ-1 (A panel) koncentrációja szignifikánsan csökkent a kezelt csoportban az első hét után [t(10)= 6,224; P <0,001***], de szignifikánsan nőtt a harmadik hét végére [t(10)= -3,586; P <0,01**]. A CREB (B panel) és a p38alpha (C panel) koncentrációjáról megállapíthatjuk, hogy szignifikánsan

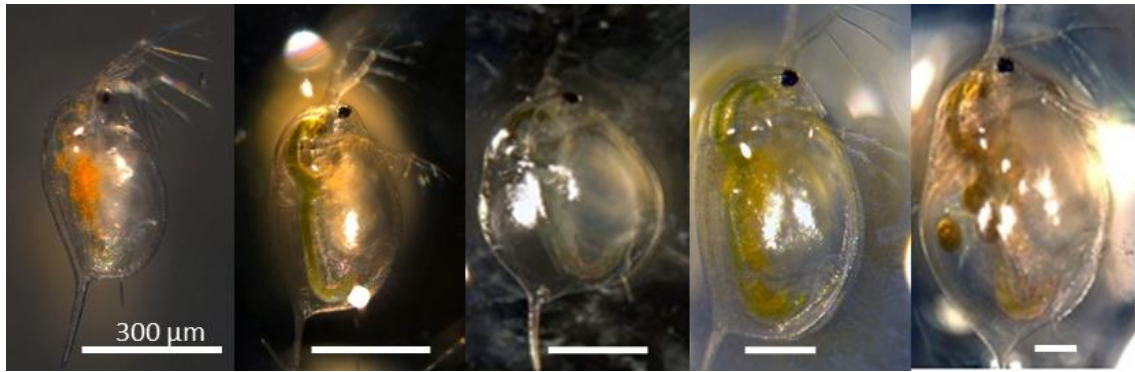
emelkedett a kezelt csoportban az első hét végére [$t(10) = -2,485$; $P < 0,05^*$; $t(10) = -2,836$; $P < 0,05^*$], azonban szignifikánsan csökkent a harmadik hét után [$t(10) = 2,464$; $P < 0,05^*$; $t(10) = 3,627$; $P < 0,05^*$]. Ugyanakkor a JNK1 molekula koncentrációja nem változott kezdetben, de szignifikánsan csökkent a harmadik hetet követően [$t(10) = 7,51131$; $P < 0,05^*$].



23. ábra: A szekvenciálisan azonosított szubcelluláris fehérjék kvantitatív elemzése a *L. stagnalis* központi idegrendszerében. Reprezentatív sandwich ELISA (A) és foszfo-MAPK array (B-D) mutatja a kulcs molekulák protein koncentrációját a kontroll és 10 ng L^{-1} progesztogénnel kezelt csigák központi idegrendszerében a kezelés első és harmadik hete után. A – függőleges tengely a DJ-1 koncentrációját [ng/mg szövet], míg a vízszintes a különböző kísérleti csoportokat ($n=10$ állat/csoport) és időpontokat jelöli. B, C, D – függőleges tengely mutatja a pixel intenzitás normalizált értékeit, míg a vízszintes tengely a különböző kísérleti csoportokat ($n=10$ állat/csoport).

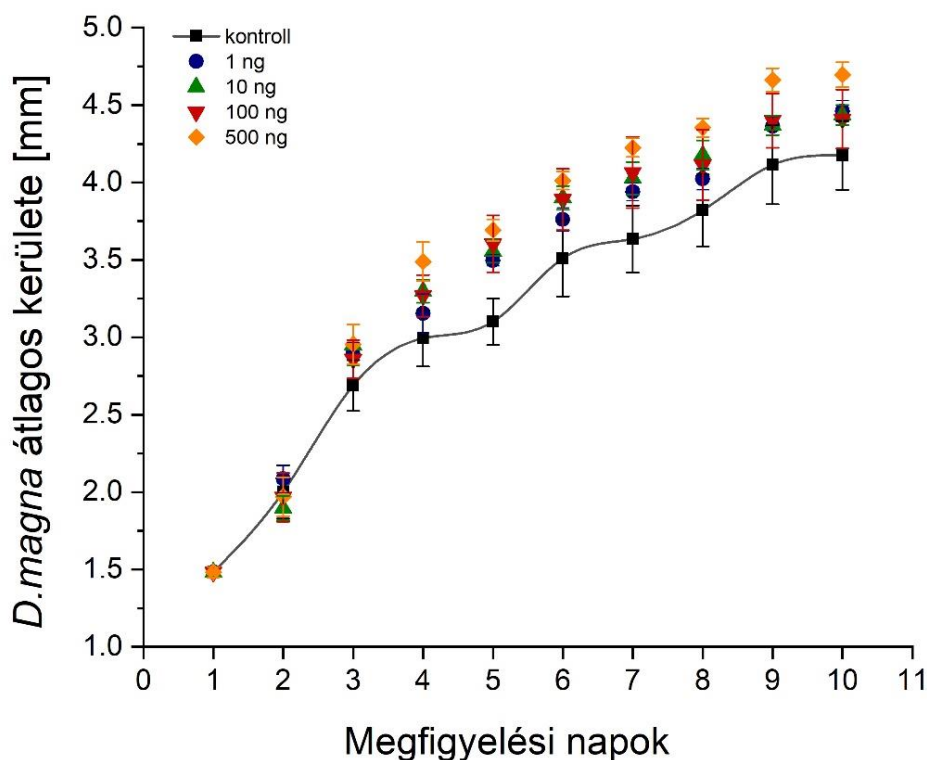
5.6 A kezelések hatása a *D. magna* növekedésére és szaporodására

A 21 napos kezelési idő alatt nem tapasztaltunk egyik kezelési csoportban sem mortalitást. A 24. ábra a *D. magna* növekedését mutatja be a kikelés utáni első naptól kezdve.



24. ábra: *D. magna* növekedése képekben. Az első képen a juvenilis, az utolsó képen a kifejlett, 5 napos állat látható petékkal a költőtásakban.

A két-utas ismételt ANOVA mérés szignifikáns eltérést mutatott az idő (megfigyelési nap) [$F(9, 263) = 282,32$; $P < 0,001$] és a kezelés [$F(4, 263) = 10,41$; $P < 0,001$] esetében, de nem eredményezett szignifikáns különbségeket az idő-kezelés interakciójának elemzése során [$F(36, 263) = 0,59$; $P > 0,05$]. Az 5. megfigyelési napon látszólag megnövekedett a kezelt csoportok egyedeinek testmérete a kontroll csoport egyedeihez képest. Ugyanokor az egyes megfigyelési napokra elvégzett egy-utas ANOVA és a Scheffe post-hoc tesztek alapján nem volt szignifikáns különbség közöttük a 10 napos megfigyelési időszak egyik napján sem (25. ábra). A látszólagos ellentmondás feloldására elvégeztünk egy további elemzést az R statisztikai programmal, a toxikológiai vizsgálatokban általában alkalmazott Dunett post-hoc teszttel is. Ennek alapján szignifikánsan megnövekedett minden kezelt csoport egyedének átlagolt testmérete az 5. megfigyelési napon a kontroll csoport egyedeihez képest ($P < 0,01$). A kiegészítő teszt eredményét a Függelék 3. ábráján tüntettük fel.



25. ábra: A *D. magna* növekedésének változása a 21 napos progesztogén kezelés során. Fekete színnel a kontroll csoportot, kék színnel az 1 ng L⁻¹-es, zöld színnel a 10 ng L⁻¹-es, piros színnel a 100 ng L⁻¹-es, míg narancssárga színnel az 500 ng L⁻¹-es csoportot jelöltük.

A 3. táblázatban foglaltuk össze a kezelések hatására megfigyelhető reprodukciós változásokat.

Kezelési csoportok (ng L ⁻¹)	Első pete megjelenése (napok)	Peteszám az első reprodukcióban	Maximális peteszám egyedenként (legnagyobb peteszám / egyed)
kontroll	8,75±0,47	4,22±0,48	10,50±0,37
1	7,25±0,25	4,86±0,51	16,05±2,02*
10	6,50±0,28*	5,28±0,67	16,01±1,59*
100	8,00±0,40	5,05±0,85	14,36±1,13
500	7,25±0,62	5,72±0,42	12,06±0,57

3. táblázat: A *D. magna* reprodukciójának változása a 21 napos különböző koncentrációjú progesztogén kezelés során. A kontrollhoz képest a különbségeket statisztikailag szignifikánsnak tekintettük $P < 0,05$ (*) esetében ($n = 6$ állat / kísérleti csoport / ismétlés). Az értékek átlagait \pm szórással tüntettük fel.

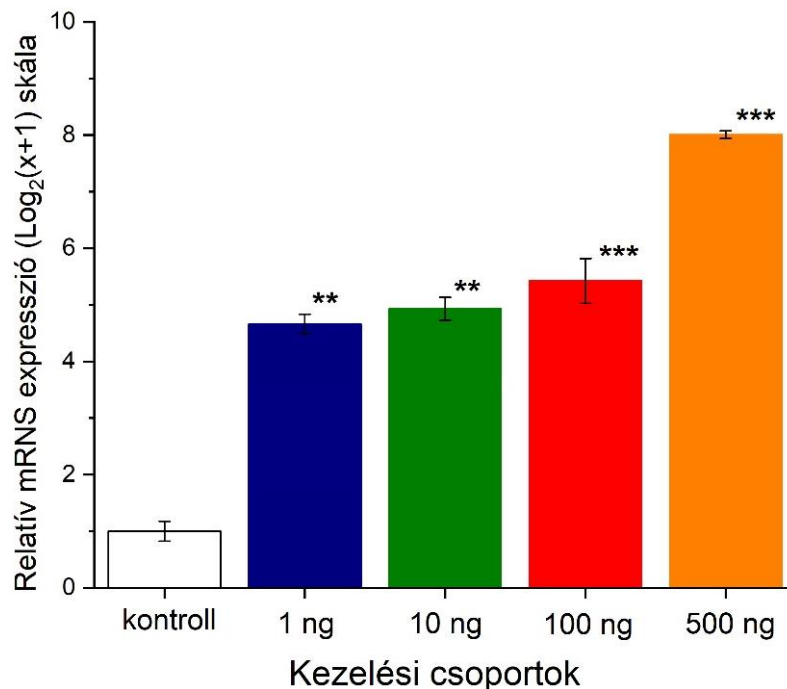
Az egy-utas ANOVA [F(4, 15)=3,9, $P < 0,05$] és post-hoc teszt eredményei azt mutatták, hogy az első peték megjelenéséhez szükséges napok száma a 10 ng L⁻¹ koncentrációnál ($6,50 \pm 0,28$) szignifikánsan kevesebb volt, mint a kontroll ($8,75 \pm 0,47$)

csoporthoz képest, azonban az első reprodukció során a peteszámok között nem volt tapasztalható szignifikáns különbség.

Az egy egyedre jutó maximális peték száma szignifikánsan nőtt ($\chi^2=17,80$, $P < 0,05$, $n=6$) az 1 ng L⁻¹-es (16,05 ± 2,02) és a 10 ng L⁻¹-es (16,01 ± 1,59) koncentrációknál a kontroll egyedekhez képest (10,50 ± 0,37).

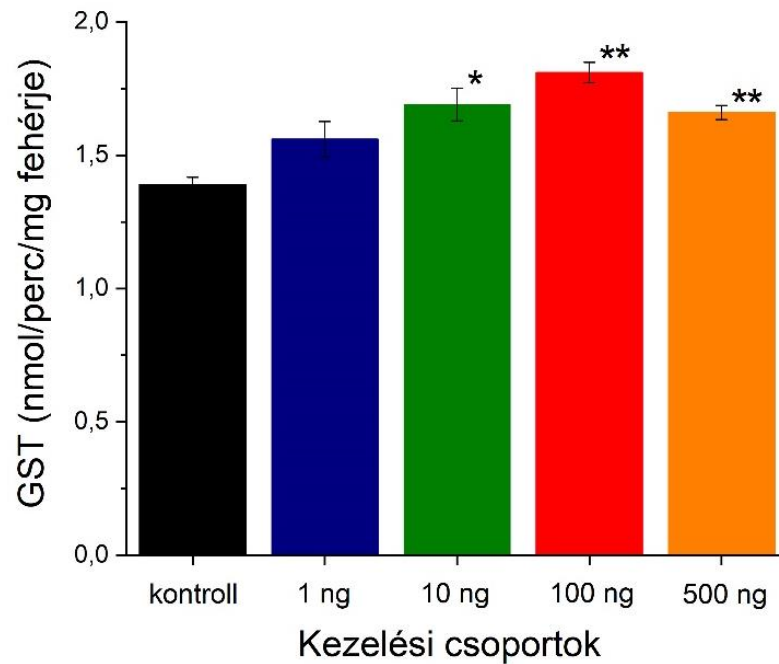
5.7 A GST génexpressziója és enzimaktivitásának változása

Célkitűzéseink alapján vizsgáltuk a progesztogén kezelés hatására megváltozó GST enzim expressziós szintjét (26. ábra). A különböző koncentrációjú kezelési csoportokban a GST relatív mRNS expresszióját a kontroll szinthez viszonyítottuk. Az egy-utas ANOVA [$F(4, 10) = 29,35$; $P < 0,05$] és post-hoc teszt eredményei azt mutatták, hogy a kontroll csoporthoz képest (1,00 ± 0,17) minden kezelési csoportban szignifikánsan megnőtt a GST enzim expressziós szintje (1 ng L⁻¹ 4,56 ± 0,17, $P < 0,01$; 10 ng L⁻¹ 4,84 ± 0,20, $P < 0,01$; 100 ng L⁻¹ 5,35 ± 0,39, $P < 0,001$; 500 ng L⁻¹ 8,00 ± 0,07, $P < 0,001$). Látható, hogy a kezelések hatására, koncentrációfüggő mértékben szignifikánsan növekszik a GST enzim expressziója (dózis-válasz hatás).



26. ábra: A GST enzim expresszió változása a *D. magna*-ban a progesztogén kezelés hatására. A GST enzim relatív mRNS expresszióját a $\text{Log}_2(x + 1)$ skálán vizsgáltuk a kontroll szinthez képest. A gén expressziója szignifikánsan megnőtt a (6 napos) progesztogén kezeléseket után, az összes alkalmazott hormon keverékben. A különbségeket statisztikailag szignifikánsnak tekintettük $P \leq 0,01$ (**); $P \leq 0,001$ (***) esetében a kontroll csoporthoz képest ($n = 20$ állat/ kísérleti csoport)

A GST enzimaktivitás változásai az 27. ábrán láthatók. Az egy-utas ANOVA [$F(4, 10) = 11,51$; $P < 0,05$] és post-hoc teszt eredményei azt mutatták, hogy nem volt szignifikáns különbség a kontroll ($1,39 \pm 0,02$) és az 1 ng L^{-1} ($1,56 \pm 0,06$; $P > 0,05$) kezelési csoport között. Ugyanakkor a GST enzimaktivitás szignifikánsan nőtt a 10 ($1,69 \pm 0,06$; $P < 0,05$), 100 ($1,81 \pm 0,03$; $P < 0,01$) és 500 ng L^{-1} ($1,66 \pm 0,01$; $P < 0,01$) progesztogén kezelt csoportokban.



27. ábra: A GST enzimaktivitásának változása rövid távú (6 napos) progesztogén kezelés hatása a *D. magnában*. A különbségeket statisztikailag szignifikánsnak tekintettük $P \leq 0,05$ (*) és $P \leq 0,01$ (**) esetében a kontrollhoz képest ($n = 20$ állat/ kísérleti csoport).

6 MEGBESZÉLÉS ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

6.1 Az elvégzett kísérletek környezeti relevanciája

Az 1. táblázatban összefoglalt irodalmi adatokból látható, hogy az általunk vizsgált hatóanyagok széles koncentráció tartományban (PRG: 0,06 – 9330,00 ng L⁻¹; LNG: 0,20 – 170,00 ng L⁻¹; GES: 0,61 – 8,30 ng L⁻¹; DRO: 0,26 – 4,30 ng L⁻¹) fordulnak elő a felszíni vizekben. A fenti adatok alapján, kísérleteinkben a környezetileg is releváns átlagos 1 és 10 ng L⁻¹, valamint, a környezetben helyenként még mérhető extrém magas (100 és 500 ng L⁻¹) progesztogén koncentrációkat alkalmaztunk.

Vizsgálatainkban - modellezve a környezeti feltételeket - hormonkeverékkel dolgoztunk, ahol a progesztogén hormonokat együttesen, keverék formájában alkalmaztuk, ahogy a környezetben is előfordulnak és detektálhatók (Guzel és mtsai, 2019, Avar és mtsai, 2016, Maász és mtsai, 2019).

A *L. stagnalis* embriókat számos ökotoxikológiai vizsgálatban, számos megfigyelési végponttal (például a kikelés idejének változása) használták már, de a legtöbb tanulmányban intakt petezsákban lévő embriókkal dolgoztak (Gomot 1998; Khangarot és Das 2010; Das és Khangarot 2011). Ugyanakkor ahogyan azt Liu és munkatársai által publikált kézirat is bemutatja (2013), ahol izolált és intakt csiga embriók (*Radix auricularia*) kadmiummal való érzékenységet hasonlították össze, a fejlődő intakt embriókat körülvevő zselés anyag megvédi őket a környezeti hatásoktól. Ez bizonyos mértékben korlátozza a csigaembriók érzékenységét, illetve az izolációval eleve kiválaszthatóak a paraziták által fertőzött peték is. Ezért az izolált petesejtek alkalmasabbnak tűnnek a toxikus vizsgálatok és kockázatértékelések elvégzéséhez az intakt petékhez képest, mivel csökkentik a fejlődő peték közötti egyéni különbségeket. Ezenkívül a korábbi vizsgálatokhoz hasonlóan (Marois és Croll, 1991; Voronezhskaya és mtsai, 1999; Filla és mtsai, 2009) az izolált petesejtek/embriók használatának még számos technikai előnye is van, például, a kikelési idők jobban szinkronizáltak, a viselkedési mintázatok pontosabban és egyszerűbben nyomon követhetők, valamint szabványosabb és reprodukálhatóbb kísérletek biztosíthatók.

6.2 Progesztogének által kiváltott változások

6.2.1 *L. stagnalis* esetében

A kutatócsoport korábbi vizsgálataiból tudjuk, hogy a szülői 10 ng L⁻¹ progesztogén kezelések megváltoztatták az embriók intrakapszuláris fejlődését, metabolit összetételét és energetikai állapotát az embrionális fejlődés korai szakaszában, azonban a szülők közvetlen kezelése nem befolyásolta az embriók kikelési idejét (Zrinyi és mtsai, 2017). Abból a célból, hogy még átfogóbb képet kapjunk a kezelések embrionális fejlődésre kifejtett hatásáról, kiterjesztettük a progesztogén kezeléseket és a teljes embrionális fejlődés szakaszában vizsgáltuk a különböző progesztogén koncentrációk (1, 10, 100 és 500 ng L⁻¹) élettani hatásait. A kontrollált laboratóriumi kísérletek elvégzése után azt találtuk, hogy az első három megfigyelési napon (10-12.) látszólag felgyorsult az embriók kikelésének dinamikája a különböző koncentrációjú progesztogén kezelésekre hatására, azonban ezek nem voltak szignifikánsak a kontroll csoporthoz képest. A 13. napon a 10 és 100 ng L⁻¹-es kezelések, a 14. napon pedig az összes kezelt csoport megmaradt egyedei szignifikánsan gyorsabban keltek ki, mint a kontroll csoport egyedei. Tehát, az izolált petesejtek közvetlen kezelése lerövidítette az embrionális fejlődés idejét és gyorsabb kikelést eredményezett. Így megállapíthatjuk, hogy az olyan külső környezeti hatások, mint például az aktív gyógyszermaradványok, befolyásolják a *L. stagnalis*, mint reprezentatív gerinctelen vízi modellszervezet embrionális fejlődését. Ennek egyik lehetséges hatásmechanizmusa lehet a fejlődő embriók energiaháztartásának indukált megváltozása. Korábbi eredményeink, miszerint megnő az embriókban a hexóz felhasználás és a szikanyagban az energia töltés (adenilát energiahordozók aránya) (Zrinyi és mtsai, 2017), alátámasztják ezt az elképzelést. Lehetséges (bár ez még jelenleg nem bizonyított), hogy a progesztogének által kiváltott fokozott energiaszükséglet az egész embrionális fejlődés során jelen van, ami magyarázhatja a különböző embrionális viselkedési tevékenységek (szívverés, kapszulán belüli mozgás, *radula* öltögetés) felgyorsulását. Természetesen a mechanizmusok pontos meghatározásához még további sejt- és/vagy molekuláris szintű vizsgálatokra van szükség, jövőbeni tervek között szerepel ezek felderítése a dinamikus energiaháztartás modell segítségével (Zonneveld és Kooijman, 1989; Kooijman 2000; Ducrot és mtsai, 2010).

A felnőtt csigák esetében a táplálkozási- és mozgási aktivitások ellentétes változása a 10 és 100 ng L⁻¹-es kezelt csoportok esetében a korábbi, központi idegrendszerben tett hálózat- és sejtszintű megfigyelésekkel magyarázható, amely alapján

ismert, hogy a menekülési neuronhálózat (Ferguson and Benjamin, 1991) motoros aktivitása még táplálék jelenlétében is képes közvetlenül gátolni az ismert táplálkozási hálózat (Elliott és Benjamin, 1989) aktivitását (Pirger és mtsai, 2014). Továbbá az is tény, hogy a két ellentétes viselkedési aktivitás kialakításának háttérében álló mozgási és táplálkozási neuron hálózatok egyetlen ismert interneuronon, a falidúcban elhelyezkedő pleurobuccal (PIB) sejten keresztül kapcsolódnak. Ez a sejt egyfajta „kapcsolóként” működik a két hálózat és magatartásforma között. Ez azt jelenti, hogy a sejt vagy az egyik, vagy a másik hálózat működését segíti kizárólagosan, saját aktivitási állapotának szabályozásán keresztül. Ha a sejt megfelelő monoszinaptikus serkentő bemenetet kap a menekülési hálózat azonosított interneuronjától (PeD12), akkor ingerületi állapotba jön (depolarizálódik) és gátolja a táplálkozási neuronhálózat ismert koordinátoros inter- (CGC, CV, OC), valamint motoros neuronjait (B sejtek). Ezek a pofadúcban található motoros neuronok felelősek a pofa izomzatának működtetéséért és a táplálkozási magatartásforma összehangolt kivitelezéséért ([1] *radula* kiöltés, [2] harapás és *radula* visszahúzás, [3] nyelés). Továbbá, a PIB sejt felelős a táplálkozáshoz köthető tanulási folyamatokért is, ahol a tanult emléknym a sejt aktivitási állapotában rögzül. Ha a tréningezett és tanult állatból a kapcsoló sejtet eltávolítjuk, akkor a megtanult információk elvesznek és a táplálkozási rendszer felszabadul a PIB szabályozása alól (Pirger és mtsai, 2020). Azonban az, hogy a hormonkezeléseknek pontosan hol van támadáspontja a felnőtt állatok vizsgált magatartásformáiban, pontosan még nem ismert.

Az endokrin diszruptorok hatásának vizsgálatánál fontos megállapítani a koncentráció és a hatás közötti kapcsolatot. Ideálisan ez a 'koncentráció-válasz' kapcsolat egy szabályosan növekvő vagy csökkenő 'monoton' görbét fog eredményezni. Azaz a koncentráció növekedésével, vagy csökkenésével a válasz grádiensszerűen nő, vagy csökken, kivéve, ha a koncentráció túl alacsony, hogy hatást váltson ki, vagy túl magas és a mérendő faktor nem tud további választ adni (Scott, 2013). Azonban ismert az irodalomból, hogy számos esetben az endokrin diszruptorok által kiváltott hatások nem követik a 'monoton' görbét, hanem például a görbe 'U', 'fordított-U', vagy szabálytalan (pl. csak 1, vagy 2 koncentráció okoz hatást és nem feltétlenül a legmagasabb és nem feltétlenül a szomszédosak) alakú (Vandenberg és mtsai, 2012; Scott, 2013). A 'nem-monoton' görbék arra utalnak, hogy egyszerre több, akár egymással ellentétes hatásmechanizmus is lehetséges, vagy jelen van (Scott, 2013). A kapott eredményekből úgy tűnhet, hogy hormetikus hatások figyelhetők meg az egyes kezelési csoportokban, de feltehetőleg a csoporton belüli relatív kevés elemszám miatt ez statisztikailag nem volt

igazolható. Ugyanakkor, feltételezésünk szerint mégis ez lehet az oka, hogy például a felnőtt csigák esetében az 500 ng L⁻¹-es kezelt csoportnál nem figyeltünk meg szignifikáns különbséget a mozgási aktivitás esetében a kontroll csoporthoz viszonyítva, ellentétben a 100 és 10 ng L⁻¹ csoportokkal. Ezeknek a háttérmechanizmusoknak a pontos meghatározása az egyik legnagyobb kihívás az ökotoxikológiában. Jövőbeni tervek között szerepel e folyamatok felderítése, tisztázása.

Az emberi eredetű hormonszennyezések által kiváltott sejtszintű lehetséges válaszokat négy releváns markermolekula (DJ-1, CREB, p38alpha és JNK1) mennyiségi változásán keresztül vizsgáltuk a *L. stagnalis* központi idegrendszerében. Ezeket a molekulákat azonosítottuk a *L. stagnalis*-ban (lásd Függelék 2. ábra) is. Méréseink során azt találtuk, hogy a vizsgált molekulák szignifikáns mennyiségi változásokat mutatnak a központi idegrendszerben a 10 ng L⁻¹-es kezelés hatására. Kiemelve, a DJ-1 fehérje mennyisége szignifikánsan megnőtt a 21 napos kezelés után, amely jó egyezést mutat korábbi eredményeinkkel, miszerint a bodorka (*Rutilus rutilus*) agyában ugyanez a hormonkeverék 10 ng L⁻¹-es koncentrációban, hosszútávú kezelés után szignifikáns növekedést okoz a DJ-1 mennyiségében (Maász és mtsai, 2017).

6.2.2 *D. magna* esetében

Korábban már leírták a progesztogének hatásait halakon (Maász és mtsai 2017; Miracle és mtsai, 2006; Runnals és mtsai, 2013; Zeilinger és mtsai, 2009) és puhatestűeken (Contardo-Jara és mtsai, 2011; Giusti és mtsai, 2014; Svigruha és mtsai, 2020; Tillmann és mtsai, 2001; Zrinyi és mtsai, 2017) kívül planktonikus rákféléken is (Barbose és mtsai, 2008; Brennan és mtsai, 2006; LeBlanc, 2000; Luna és mtsai, 2015; Rodríguez és mtsai, 2007). Továbbá, a PRG hatását µg L⁻¹ – mg L⁻¹-es koncentrációtartományban ugyan vizsgálták a *D. magna* fejlődése tekintetében (Kashian és Dodson, 2004; Torres és mtsai, 2015), de a disszertációban bemutatott vizsgálat volt az első olyan, amelyben a progesztogének hatását keverékben, környezetileg is releváns koncentrációkban tanulmányoztuk. A lehetséges toxikus hatásokat különböző szerveződési szinteken: egyed (fejlődés és szaporodás), sejt (pl. méregtelenítő rendszer) és molekula határoztuk meg.

Az állatok, függetlenül a kezelésektől, a 21 napig tartó vizsgálat során folyamatosan és szignifikáns mértékben növekedtek, a két-utas ismételt ANOVA teszt alapján. Ugyanakkor azt is meg kell jegyezni, hogy a kezelések során nem tudtunk kimutatni szignifikáns változásokat a *D. magna* átlagos kerületében (testméretében) a

kontroll és kezelt csoportok között a teljes, 21 napos megfigyelési időszak bármely napján. Azaz, a progesztogén kezelés önmagában nem befolyásolta a növekedés ütemét kísérletünkben. Ez a megfigyelésünk összhangban áll egy korábbi vizsgálattal, ahol a $100 \mu\text{g L}^{-1}$ -es hosszútávú (25 napos) PRG kezelés szintén nem okozott változást a növekedés ütemében (Kashian és Dodson, 2004). Ezzel szemben Dietrich és munkatársai (2010) megfigyelték, hogy az EE2 $0,1 \text{ ng L}^{-1}$ -es koncentrációjánál csökkentette a *D. magna* testméretét. A progesztogén kezelések során nem tapasztaltunk mortalitást, sem peteelhalást. Köztudottan számos PhAC, például a diklofenak és az ibuprofen is jelentősen késlelteti az első peték megjelenését a juvenilis állatban (Heckmann és mtsai, 2007; Liu és mtsai, 2017). Ezzel szemben mi azt tapasztaltuk, hogy a 10 ng L^{-1} -es kezelések hatására szignifikánsan rövidebb idő telt el az első peték megjelenéséig a kontroll csoporthoz képest. Azonban az első reprodukció során a peteszámok között nem tapasztaltunk szignifikáns különbségeket a kontroll és a kezelt csoportok között. Így elmondhatjuk, hogy a növekedés üteméhez hasonlóan a progesztogén kezelés nem befolyásolta a peteszámok alakulását. Ugyanakkor Dietrich és munkatársai (2010) azt tapasztalták, hogy a $0,1 \text{ ng L}^{-1}$ EE2-vel kezelt *Daphnia* egyedek kevesebb utódot hoztak világra, míg mi azt tapasztaltuk, hogy az egy egyedre jutó maximális petesejtek száma szignifikánsan magasabb volt az 1 és 10 ng L^{-1} -es progesztogén koncentrációjánál a kontroll csoporthoz képest. A maximális peteszám növekedése a termékenység növekedését is okozta. Hasonló hatást mutatott ki kutatócsoportunk korábban is, amikor a *L. stagnalis* egyedeit 10 ng L^{-1} -es progesztogén keverékkel kezelték 21 napig (Zrinyi és mtsai, 2017). Ez a hatás azonban ellentétben áll számos más tanulmányban leírt eredménnyel, ahol ezeknek a vegyületeknek a környezeti szempontból releváns koncentrációja gátló hatást fejtett ki a halak ikratermelésére (Orlando és Ellestad, 2014; Thrupp és mtsai, 2018). Ezen kívül a hosszútávú T kezelések (mg L^{-1} koncentráció), szintén csökkenő termékenységet eredményeztek (Barbosa és mtsai, 2008; Clubbs és Brook, 2007). Brennan és mtsai. (2006) azt találták, hogy az E2 nem befolyásolta szignifikánsan a *D. magna* termékenységét mg L^{-1} -es koncentrációban. Ezenkívül a hosszútávú (40 napos), környezeti szempontból is releváns 100 ng L^{-1} -es EE2-kezelések csökkentették az egy nőtényre/egyedre jutó újszülöttek számát (Luna és mtsai, 2015). Hosszútávú (25 napos) $100 \mu\text{g L}^{-1}$ -es progeszteron kezelésekben megfigyelték korábban, hogy az újszülöttek között több hím utód jött létre, mint nőtény (Kashian és Dodson, 2004). Ilyen megfigyelést a progesztogén kezelések esetében kutatócsoportunk nem tett.

Számos irodalmi adat ismert a *D. magna*-ban vizsgált biokémiai markerekről (Jemec és mtsai, 2007), azonban a progesztogénnel kezelt egyedek biomarkereinek - molekuláris és sejtes reakcióinak - változásáról nincsenek elérhető információk. Az eddigi vizsgálatok azt mutatták, hogy számos környezetszennyező anyag befolyásolhatja a méregtelenítéssel és az antioxidáns rendszerrel kapcsolatos enzimaktivitást és génexpressziót (Wang és mtsai, 2016). Több tanulmány leírta, hogy a nemi szteroid expozíciók molekuláris és sejtes hatásait különböző metabolikus útvonalak enzimatisz biomarkereivel lehet vizsgálni nem célfajok esetében. Ilyenek például az antioxidáns enzimválaszok is (Cardoso et al., 2019; Costa et al., 2010; Lee és Choi, 2007; Linlan és mtsai, 2016; Teles és mtsai, 2005; Woo és mtsai, 2012). Az egyik ilyen többkomponensű enzim a GST, amelyről ismert, hogy részt vesz számos toxikus antropogén anyag méregtelenítésében, és fontos szerepet játszik a szövetek oxidatív stressztől való védelmében is (Yu és mtsai, 2009; Gowlan és mtsai, 2002; Imhofe és mtsai, 2017; Mörtl és mtsai, 2020; Yoo és mtsai, 2019). Korábbi ökotoxikológiai tanulmányokban (Teles és mtsai., 2005; Woo és mtsai., 2012) és a fereg-fajokban (Linlan és mtsai., 2016) megállapították, hogy az EE2 hatására megnövekedett a halakban a GST aktivitása és expressziós szintje.

Jelen értekezésben megvizsgáltuk a progesztogén keverékek hatását a GST enzim expressziós szintjére és aktivitására. Megállapítottuk, hogy a GST expressziós szintje szignifikánsan magasabb volt az alkalmazott progesztogén koncentrációk esetében a kontroll csoporthoz képest. Emellett a GST enzim aktivitása is fokozódott 10, 100 és 500 ng L⁻¹ -es kezelt csoportok esetében. Mivel a GST részt vesz a sejtekből a reaktív oxigénformák eltávolításában (Kim és mtsai, 2009), eredményeink azt mutatják, hogy a progesztogének kölcsönhatásba léphetnek az oxidatív stressz válaszokhoz kapcsolódó útvonalakkal is. Folyamatos vita folyik arról, hogy a környezetben kimutatható gerinces szervezetek endogén hormonjai és a szintetikus nemi szteroid hormonok maradványai vajon befolyásolhatják-e a gerinctelen fajok neuroendokrin rendszerét és fiziológiai folyamatait (Dang és mtsai, 2012; Fodor et al., 2020; Luna és mtsai, 2015; Rodríguez és mtsai, 2007; Scott, 2013). Fontos megjegyezni, hogy például a gerinces szteroid bioszintetikus utat katalizáló enzimek, valamint a funkcionális, nukleáris szteroid receptorok több homológját ez idáig nem találták meg az ízeltlábúak genomjában sem (Markov és mtsai, 2017). A progesztogénekre összpontosítva azonban megállapíthatjuk, hogy rákfélékben megtalálhatóak olyan homológ szekvenciák, mint pl. a progeszteron-receptor gamma (mPR γ) és a progeszteron-membrán-receptor 1. komponensei

(PGMRC1) (Ren és mtsai, 2019). Bár ezeknek a molekuláknak a progeszteron-kötő képességét még nem vizsgálták a gerinctelenekben, potenciális közvetítő molekulák lehetnek a progesztogének által kiváltott viselkedési változások mögötti sejtes és molekuláris folyamatokban (nem genomikus jelátviteli útvonal/ak). Molekuláris, sejtes és viselkedési válaszok alapján számos tanulmány bemutatta, hogy (Barbosa és mtsai, 2008; Brennan és mtsai, 2006; Clubbs és Brooks, 2007; Dietrich és mtsai, 2010; Kashian és Dodson, 2004; Luna és mtsai, 2015; Torres és mtsai, 2015; Zheng és mtsai, 2020), a *D. magna* érzékeny a természetes élőhelyein előforduló szteroid szennyezésekre. Kísérleteink megerősítették ezt a megállapítást, hiszen a 10 ng L⁻¹-es progesztogén kezelések befolyásolták az első pete megjelenéséig eltelt időt, valamint az 1 és a 10 ng L⁻¹-es koncentrációk módosították a maximális, egyszerre létrehozott peteszámot is. Az átlagos környezeti és extrém magas koncentrációk egyaránt befolyásolták a GST enzim expresszióját (1, 10, 100 és 500 ng L⁻¹) és aktivitását is (10, 100 és 500 ng L⁻¹). Mindezen megfigyelések alapján úgy tűnik, hogy a *D. magna* érzékeny az élőhelyén is előforduló szex szteroid szennyezésekre, de ezeknek a szintetikus vegyületeknek a toxikus hatásai mögött álló mechanizmusok még nem teljesen ismertek. Azonosított funkcionális, klasszikus nukleáris szex szteroid receptorok hiányában a mechanizmusok lejátszódhatnak például membrán „progeszteron” receptorokon, vagy nem specifikus interakciók révén is (pl. ősi multifunkcionális receptorokon, vagy más vegyületek receptorán).

7 ÖSSZEFOGLALÁS

Az emberi eredetű szintetikus szteroid hormonok jelenléte a vízi ökoszisztémákban egy világszerte ismert és aggasztó probléma, hiszen ezek a gyógyszermaradványok hatással lehetnek a különböző, egyébként nem célzott gerinctelen és gerinces vízi szervezetekre, például a puhatestűekre, egyaránt. A progesztogének a környezetben viszonylag széles koncentrációtartományban mozognak, átlagosan a néhány ng L^{-1} -től a néhány száz ng L^{-1} -ig bezárólag.

Munkám célja volt megvizsgálni, hogy a progesztogének keverékével (PRG, DRO, LNG, GES) a környezetben is kimutatható koncentrációkban vajon milyen változásokat képesek indukálni a *L. stagnalis* embrionális fejlődésében és viselkedésében, valamint a felnőtt egyedek mozgási és táplálkozási aktivitásában. Számos, a progesztogének keverékével kiváltott változást figyeltünk meg az embriók fejlődési ütemében, pulzusszámában, a csillók által történő mozgási és táplálkozási tevékenységében, valamint a felnőtt egyedek táplálkozási és mozgási aktivitásában. Eredményeink alapján megállapítható, hogy a vizsgált progesztogének - amelyek a *L. stagnalis* természetes élőhelyein is előfordulnak - átlagosan jellemző környezeti koncentrációban ($\sim 10 \text{ ng L}^{-1}$) már befolyásolták mind az embriók, mind a felnőtt egyedek élettani folyamatait egyaránt. A progesztogének ilyen jellegű hatásairól, ilyen megközelítésben korábban még nem született tudományos közlemény puhatestű fajokon. Az alkalmazott kísérleti elrendezés és módszerek okán úgy gondolom, hogy eredményeink ökológiai relevanciája megfelelő.

A disszertációban négy lehetséges marker molekula potenciális szerepét mutattuk be, azonban a funkcionális „gerinctelen” szteroid receptorok nélkül a fiziológiai és viselkedési hatások mögött álló molekuláris mechanizmusok jelenleg még nem ismertek pontosan. Ezért a jövőbeni kutatásoknak a már ismert jelenségek háttérében álló sejtes és molekuláris folyamatok pontosabb feltárását, megértését kell célozniuk. Mindezen vizsgálatok jó alanya lehet a *L. stagnalis* a jövőben is. Véleményem szerint az ilyen jellegű kutatások eredményei lehetővé tehetik a progesztogének hatásmódjának teljes körű megismerését és utat nyithatnak az ökotoxikus hatások részletesebb megértéséhez is.

A disszertációban bemutattuk a progesztogének *D. magna*-ra gyakorolt eddig nem ismert, lehetséges hatásait is viselkedési- sejtes- és molekuláris változások alapján. Eredményeink rámutatnak arra, hogy ezek a hatóanyagok környezeti szempontból

releváns koncentrációkban befolyásolták az első peték megjelenéséig eltelt időt és az egyénekenkénti maximális peteszámot egyaránt, továbbá hatással voltak a GST enzim expressziójára és aktivitására, így a detoxikáló mechanizmusokat is aktiválták.

Összefoglalva: a tesztelt keverékre adott reakciókban a hasonlóságok és különbségek összehasonlítása a két fajban nem könnyű, hiszen eltérő végpontokat vizsgáltunk. Néhány végpontot egy időpontban, míg másokat időintervallumban figyeltünk meg. A különböző koncentrációjú keverékre, a különböző végpontok mindkét faj esetében többféle, úgynevezett 'koncentráció-válasz' kapcsolatot is mutatott. Kísérleteink eredményei azonban bizonyították, hogy a progesztogének környezetileg is releváns koncentrációkban befolyásolják olyan gerinctelen vízi modellszervezetek - mint a *L. stagnalis* és a *D. magna* - számos élettani folyamatát és aktivitását, így az emberi eredetű progesztogén szennyezések kihívást jelenthetnek az ökoszisztémában élő más, eddig még nem vizsgált, szervezetek számára is. Véleményem szerint a változások mögött álló háttérmechanizmusoknak a pontos meghatározására hatalmas igény mutatkozik, így a jövőbeli ökotoxikológiai kutatások egyik legnagyobb kihívása ezeknek a kérdéseknek a megválaszolása lehet.

8 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Az egyetemi diplomám megszerzése után **Prof. Dr. Padisák Judit** és **Dr. Pirger Zsolt** témavezetőim biztatására megkezdtem PhD tanulmányaimat a Pannon Egyetem Kémiai és Környezettudományi Doktori Iskolájában, valamint a kísérletes munkáimat a Balatoni Limnológiai Kutatóintézetben működő Adaptációs Neuroetológiai, majd Ökofiziológiai és Környezettoxikológiai Kutatócsoportban. Ezúton szeretnék köszönetet mondani nekik segítségükért, szakmai vezetésükért, előremutató tanácsaikért, türelmükért és a felmerülő problémák leküzdésében nyújtott segítségükért, amelyek nélkülözhetetlenek voltak az évek alatt. Külön köszönettel tartozom támogatásukért, biztatásukért, hogy mind a hazai, mind a nemzetközi konferenciákon részt vehettem és új tudományos ismeretekre tehettem szert.

Hálás szívvel mondok köszönetet a Balatoni Limnológiai Kutatóintézet volt és jelenlegi vezetőjének, **Prof. Dr. G-Tóth Lászlónak** és **Prof. Dr. Erős Tibornak**, továbbá dolgozóinak, kiemelve pl. **Dr. Takács Pétert**, aki az első szárnypróbálgatásaimat kísérte nyomon a nyári gyakorlatok alkalmával, és megszerettette velem a terepi munkákat és a halakat is. A Nemzeti Agykutató Program Adaptációs Neuroetológiai Kutatócsoport jelenlegi munkatársainak, - **Dr. Molnár Éva**, **Dr. Felpécziné Farkas Anna**, **Dr. Győri János**, **Horváth Réka**, **Nagyné Fekete Zsuzsa**, **László Zita** - akik lelkesen és türelmesen segítettek kísérletes munkáim megtervezését, kivitelezését. Külön köszönettel tartozom **Fodor Istvánnak** szakmai, baráti segítségéért, biztató szavaiért és azért, mert sosem mondott nemet. Valamint az intézet emeritus professzorainak, **Prof. Dr. Elekes Károlynak**, **Prof. Dr. Kiss Tibornak**, és **Dr. Vehovszky Ágnesnek**, akik hasznos tanácsaikkal és észrevételeikkel segítettek a munkámat.

Köszönetemet szeretném kifejezni a **Limnológiai Intézeti Tanszék minden dolgozójának**, akik segítettek munkámat és előrehaladásomat.

Köszönettel tartozom továbbá **Dr. Zrínyi Zitának**, aki beavatott a csigaembrió preparálás fortélyaiba, **Dr. Várbíró Gábornak** a statisztikai elemzések elvégzésében nyújtott rendületlen segítségéért.

És nem utolsó sorban, köszönettel és hálával tartozom **családomnak**, akik mindvégig mellettem voltak, támogattak és szeretettel és türelemmel egyengették az utamat, **barátaimnak**, akik ha el is bizonytalanodtam, mindig megtalálták a megfelelő biztató szót. Segítségük számomra felejtethetlen!

9 IRODALOMJEGYZÉK

Adema CM, van Deutekom-Mulder EC, van der Knaap WP, Sminia T (1994) Schistosomicidal activities of *Lymnaea stagnalis* haemocytes: the role of oxygen radicals. *Parasitology*. 1994 Nov;109 (Pt 4):479-85.

ASTM (2008) Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. In: Annual Book of ASTM Standards; Water and Environmental Technology, vol. 11.04; ASTM E729 – 96 (2007) American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA Aherne GW, English J, Marks V (1985) The role of immunoassay in the analysis of microcontaminants in water samples. *Ecotox Environ Saf.* 9:79-83.

Al-Odaini NA, Zakaria MP, Yaziz MI, Surif S (2010) Multi-residue analytical method for human pharmaceuticals and synthetic hormones in river water and sewage effluents by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2010 Oct 29;1217(44):6791-806.

Altelaar AF, van Minnen J, Jiménez CR, Heeren RM, Piersma SR (2005) Direct molecular imaging of *Lymnaea stagnalis* nervous tissue at subcellular spatial resolution by mass spectrometry. *Anal Chem*. 2005 Feb 1;77(3):735-41.

Alzieu C (2000) Environmental impact of TBT: the French experience. *Sci Total Environ*. 2000 Aug 21;258(1-2):99-102.

Ammann AA, Macikova P, Groh KJ, Schirmer K, Suter MJF (2014) LC– MS/MS determination of potential endocrine disruptors of cortico signalling in rivers and wastewaters. *Anal Bioanal Chem*. 2014 Nov;406(29):7653-65.

Amorim J, Abreu I, Rodrigues P, Peixoto D, Pinheiro C, Saraiva A, Carvalho AP, Guimarães L, Oliva-Teles. L (2019) *Lymnaea stagnalis* as a freshwater model invertebrate for ecotoxicological studies. *Sci Total Environ*. 2019 Jun 15;669:11-28.

Andrási N, Molnár B, Dobos B, Vasanits-Zsigrai A, Záray G, Molnar-Perl I (2013) Determination of steroids in the dissolved and in the suspended phases of wastewater and Danube River samples by gas chromatography, tandem mass spectrometry. *Talanta*. 2013 Oct 15;115:367-73.

Archer DF (2007) Drospirenone and estradiol: a new option for the postmenopausal woman. *Climacteric*. 2007 Feb;10 Suppl 1:3-10.

Aris AZ, Shamsuddin AS, Praveena SM (2014) Occurrence of 17 α -ethynylestradiol (EE2) in the environment and effect on exposed biota: a review. *Environ Int*. 2014 Aug;69:104-19.

Atli G, Grosell M (2016) Characterization and response of antioxidant systems in the tissues of the freshwater pond snail (*Lymnaea stagnalis*) during acute copper exposure. *Aquat Toxicol*. 2016 Jul;176:38-44.

Avar P, Zrínyi Z, Maász G, Takátsy A, Lovas S, G-Tóth L, Pirger Z (2016a) β -Estradiol and ethinyl-estradiol contamination in the rivers of the Carpathian Basin. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2016 Jun;23(12):11630-8.

- Avar P, Maász G, Takács P, Lovas S, Zrinyi Z, Svigruha R, TakátsyA, G-Tóth L, Pirger Z** (2016b) HPLC-MS/MS analysis of steroid hormones in environmental water samples. *Drog Test Anal.* 2016 Jan;8(1):123-7.
- Barbosa IR, Nogueira AJ, Soares AM** (2008) Acute and chronic effects of testosterone and 4-hydroxyandrostenedione to the crustacean *Daphnia magna*. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2008 Nov;71(3):757-64.
- Basdevant A** (1979) Metabolic effects of oral contraceptives: influence of the dosage and nature of the substance used. *Contracept Feril Sex (Paris)* 1979 Nov;4(11):781-5.
- Becker KL** (2001) Principles and Practice of Endocrinology and Metabolism. Lippincott Williams & Wilkins. pp. 1024–. ISBN 978-0-7817-1750-2.
- Behera SK, Kim HW, Oh JE, Park HS** (2011) Occurrence and removal of antibiotics, hormones and several other pharmaceuticals in wastewater treatment plants of the largest industrial city of Korea. *Sci Total Environ.* 2011 Sep 15;409(20):4351-60.
- Bengal E, Aviram S, Hayek T** (2020) p38 MAPK in glucose metabolism of skeletal muscle: beneficial or harmful. *Int J Mol Sci.* 2020 Sep 4;21(18):6480.
- Benjamin PR** (2008) In: *Lymnaea*. Scholarpedia, pp. 4124.
- Berrie AD** (1965) On the life cycle of *Lymnaea stagnalis* (L.) in the West of Scotland. *J Molluscan Stud.* 36:283–295.
- Besse JP, Garric J** (2009) Progestogens for human use exposure and hazard assessment for the aquatic environment. *Environ Pollut.* 2009 Dec;157(12):3485-94.
- Bhandari RK, Deem SL, Holliday DK, Jandegian CM, Kassotis CD, Nagel SC, Tillitt DE, Vom Saal FS, Rosenfeld CS** (2015) Effects of the environmental estrogenic contaminants bisphenol A and 17 α -ethinyl estradiol on sexual development and adult behaviors in aquatic wildlife species. *Gen Comp Endocrinol.* 2015 Apr 1;214:195-219.
- Blackshear KK, Giessner S, Hayden JP, Duncan KA** (2017) Exogenous progesterone is neuroprotective following injury to the male zebra finch brain. *J Neuro Res.* 2018 Apr;96(4):545-555.
- Boag DA, Pearlstone PSM** (1979) On the life cycle of *Lymnaea stagnalis* (Pulmonata: Gastropoda) in southwestern Alberta. *Can J Zool.* 57:353-362.
- Brennan SJ, Brougham CA, Roche JJ, Fogarty AM** (2006) Multi-generational effects of four selected environmental oestrogens on *Daphnia magna*. *Chemosphere.* 2006 Jun;64(1):49-55.
- Calabrese EJ, Baldwin LA** (2003) The hormetic dose-response model is more common than the threshold model in toxicology. *Toxicol Sci.* 2003 Feb;71(2):246-50.
- Caldwell DJ, Mastrocco F, Hutchinson TH, Lange R, Heijerick D, Janssen C, Anderson PD, Sumpter JP** (2008) Derivation of an aquatic predicted no-effect concentration for the synthetic hormone, 17 α -ethinyl estradiol. *Environ Sci Technol.* 2008 Oct 1;42(19):7046-54.
- Can ZS, Firlak M, Kerc A, Evcimen S** (2014) Evaluation of different wastewater treatment techniques in three WWTPs in Istanbul for the removal of selected EDCs in liquid phase. *Environ Monit Assess.* 2014 Jan;186(1):525-39.

- Chang H, Wan Y, Hu J** (2008) Determination and source apportion of five classes of steroid hormones in urban rivers. *Environ Sci Technol.* 2009 Oct 15;43(20):7691-8.
- Chang H, Wan Y, Wu S, Fan Z, Hu J** (2011) Occurrence of androgens and progesterones in wastewater treatment plants and receiving river waters: Comparison to estrogens. *Water Res.* 2011 Jan;45(2):732-40.
- Christin-Maitre S** (2013) History of oral contraceptive drugs and their use worldwide. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2013 Feb;27(1):3-12.
- Christiansen C** (2005) Effects of drospirenone/estrogen combinations on bone metabolism. *Climacteric.* 2005 Oct;8 Suppl 3:35-41.
- Clubbs RL, Brooks BW** (2007) *Daphnia magna* responses to a vertebrate estrogen receptor agonist and an antagonist: a multigenerational study. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2007 Jul;67(3):385-98.
- Contardo- Jara V, Lorenz C, Pflugmacher S, Nutzmann G, Kloas W, Wiegand C** (2011) Molecular effects and bioaccumulation of levonorgestrel in the non-target organism *Dreissena polymorpha*. *Environ Pollut.* 2011 Jan;159(1):38-44.
- Costa DD, Neto FF, Costa MD, Morais RN, Garcia JR, Esquivel BM, Ribeiro CA** (2010) Vitellogenesis and other physiological responses induced by 17-beta-estradiol in males of freshwater fish *Rhamdia quelen*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2010 Mar;151(2):248-57.
- Csaba G, Bierbauer J** (1979) Effect of oestrogenic, and androgenic and gestagenic hormones on the gametogenesis (oogenesis and spermatogenesis) in the snail *Helix pomatia*. *Acta Biol Med Ger.* 1979;38(8):1145-8.
- Czech P, Weber K, Dietrich DR** (2001) Effects of endocrine modulating substances on reproduction in the hermaphroditic snail *Lymnaea stagnalis* L. *Aquat Toxicol.* 2001 Jul;53(2):103-14.
- Dang Z., Cheng Y., Chen H., Ciu Y., Yin H., Traas T., Vermeire T.** (2012): Evaluation of the *Daphnia magna* reproduction test for detecting endocrine disruptors. *Chemosphere.* 2012 Jul;88(4):514-23.
- Das S, Khangarot BS** (2011) Bioaccumulation of copper and toxic effects on feeding, growth, fecundity and development of pond snail *Lymnaea luteola* L. *J Hazard Mat.* 2011 Jan 15;185(1):295-305.
- Davison A, Blaxter ML** (2005) An expressed sequence tag survey of gene expression in the pond snail *Lymnaea stagnalis*, an intermediate vector of Trematodes [corrected]. *Parasitology.* 2005 May;130(Pt 5):539-52.
- DeFur PL, Crane M, Ingersoll C, Tattersfield L** (1999) Endocrine disruption in invertebrates: endocrinology, testing and assessment. SETAC Technical Publications, Belgium
- Di Cristo C, De Lisa E, Di Cosmo A** (2008) Control of GnRH expression in the olfactory lobe of *Octopus vulgaris*. *Peptides.* 2009 Mar;30(3):538-44.
- DeQuattro ZA, Peissig EJ, Antkiewicz DS, Lundgren EJ, Hedman CJ, Hemming JD, Barry TP** (2012) Effects of progesterone on reproduction and embryonic

development in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). Environ Toxicol Chem. 2012 Apr;31(4):851-6.

De Souza CP, Martins EV, Dias EP, Katz N (1978) Influência de hormônios de vertebrados sobre reprodução de *Biomphalaria glabrata* e na infecção pelo *Schistosoma mansoni* [Vertebrate hormones influence on the reproduction of *Biomphalaria glabrata* and on *Schistosoma mansoni* infection (author's transl)]. Rev Bras Pesqui Med Biol. 1978 Jun;11(2-3):135-40. Portuguese.

Dietrich S, Ploessl F, Bracher F, Laforsch C (2010) Single and combined toxicity of pharmaceuticals at environmentally relevant concentrations in *Daphnia magna*- A multigenerational study. Chemosphere. 2010 Mar;79(1):60-6.

Drospirenone; Ethinyl Estradiol (2020) - Drug Usage Statistics. ClinCalc. Retrieved.

Ducrot V, Teixeira- Alves M, Lopes C, Delignette-Muller ML, Charles S, Lagadic L (2010) Development of partial life- cycle experiments to assess the effects of endocrine disruptors on the freshwater gastropod, *Lymnaea stagnalis*: a casestudy with vinclozolin. Ecotoxicology. 2010 Oct;19(7):1312-21.

Ducrot V, Askem C, Azam D, Brettschneider D, Brown R, Charles S, Lagadic L (2014) Development and validation of an OECD reproductive toxicity test guideline with the pond snail *Lymnaea stagnalis* (Mollusca, Gastropoda). Regular Toxicol Pharmacol. 2014 Dec;70(3):605-14.

Ebert D, Lipsitch M, Mangin KL (2000) The effect of parasites on host population density and extinction: Experimental epidemiology with *Daphnia* and six microparasites. Am Nat. 2000 Nov;156(5):459-477.

Ebert D, Bethesda MD (2005) National Center for Biotechnology Information (US); Chapter 2 Introduction to *Daphnia* Biology.

Elliott CJ, Benjamin PR (1989) Esophageal mechanoreceptors in the feeding system of the pond snail, *Lymnaea stagnalis*. J Neurophysiol. 1989 Apr;61(4):727-36.

Fan Z, Wu S, Chang H, Hu J (2011) Behaviors of glucocorticoids, androgens and progestogens in a municipal sewage treatment plant: comparison to estrogens. Environ Sci Technol. 2011 Apr 1;45(7):2725-33.

Fent K (2015) Progestins as endocrine disrupters in aquatic ecosystems: Concentrations, effects and risk assessment. Environ Int. 2015 Nov;84:115-30.

Ferguson GP, Benjamin P (1991) The whole-body withdrawal response of *Lymnaea stagnalis*. II. Activation of central motoneurons and muscles by sensory input. J Exp Biol. 1991 Jul;158:97-116.

Fernandes D, Loi B, Porte C (2010) Biosynthesis and metabolism of steroids in mulluscs. J Steroid Biochem Mol Biol. 2011 Nov;127(3-5):189-95.

Ferte´ H, Depaquit J, Carre´ S, Villena I, Le´ ger N (2005) Presence of *Trichobilharzia szidati* in *Lymnaea stagnalis* and *T. franki* in *Radix auricularia* in northeastern france: molecular evidence. Parasitol Res. 2005 Jan;95(2):150-4.

Filla A (2008) A szerotonin és dopamine szerepe a nagy mocsári csiga (*Lymnaea stagnalis*) embriógenézisében és embrionális viselkedésformáinak szabályozásában. PhD értekezés, BLKI, Tihany.

- Filla A, Hiripi L, Elekes K** (2009) Role of aminergic (serotonin and dopamine) systems in the embryogenesis and different embryonic behaviors of the pond snail, *Lymnaea stagnalis*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2009 Jan;149(1):73-82.
- Fodor I, Hussein AA, Benjamin PR, Koene JM, Pirger Z** (2020a) The unlimited potential of the great pond snail, *Lymnaea stagnalis*. *eLife* 9, 2020 Jun 16;9:e56962.
- Fodor I, Urbán P, Scott AP, Pirger Z** (2020b) A critical evaluation of some of the recent so-called ‘evidence’ for the involvement of vertebrate-type sex steroids in the reproduction of mollusks. *Mol Cell Endocrinol*. 2020 Oct 1;516:110949.
- Fodor I, Urbán P, Kemenes G, Koene JM, Pirger Z** (2020c) Aging and disease-relevant gene products in the neuronal transcriptome of the great pond snail (*Lymnaea stagnalis*): a potential model of aging, age-related memory loss, and neurodegenerative diseases. *Invert Neurosci*. 2020 May 24;20(3):9.
- Frankel TE, Meyer MT, Orlando EF** (2016) Aqueous exposure to the progestin, levonorgestrel, alters anal fin development and reproductive behavior in the eastern mosquitofish (*Gambusia holbrooki*). *Gen Comp Endocrinol*. 2016 Aug 1;234:161-9.
- Giusti A, Leprince L, Mazzucchelli G, Thomé JP, Lagadic L, Ducrot V, Joaquim-Justo C** (2013) Proteomic analysis of the reproductive organs of the hermaphroditic gastropod *Lymnaea stagnalis* exposed to different endocrine disrupting chemicals. *PLoS One*. 2013 Nov 19;8(11):e81086.
- Giusti A, Lagadic L, Bars A, Thomé JP, Joaquim-Justo C, Ducrot V** (2014) Investigating apical adverse effects of four andocrine active substances in the freshwater gastropod *Lymnaea stagnalis*. *Sci Total Environ*. 2014 Sep 15;493:147-55.
- Gomot A** (1998) Toxic effects of cadmium on reproduction, development, and hatching in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis* for water quality monitoring. *Ecotoxicol Environ Saf*. 1998 Nov;41(3):288-97.
- Gowlan BT, Moffat CF, Stagg RM, Houlihan DF, Davies IM** (2002) Cypermethrin induces glutathione S-transferase activity in the shore crab, *Carcinus maenas*. *Mar Environ Res*. 2002 Aug;54(2):169-77.
- Guzel EY, Cevik F, Daglioglu N** (2019) Determination of pharmaceutical active compounds in Ceyhan River, Turkey: Seasonal, spatial variations and environmental risk assessment. *Hum Ecol Risk Assess*. 25:1980–1995.
- Hallmann A, Konieczna L, Swiezak J, Milczarek R, Somolarz K** (2019) Aromatisation of steroids in the bivalve *Mytilus trossulus*. *PeerJ*. 2019 May 22;7:e6953.
- Hastie T, Tibshirani R** (1986) Generalized Additive Models. *Statist Sci*. 1986 1(3):297–310.
- Hatcher RA, Nelson AL** (2007) *Contraceptive Technology*. Ardent Media. pp. 196–. ISBN 978-1-59708-001-9.
- Helenkár A, Sebok A, Záray G, Molnár-Perl I, Vasanits-Zsigrai A** (2010) The role of the acquisition methods in the analysis of the non-steroidal anti-inflammatory drugs in Danube River by gas chromatography-mass spectrometry. *Talanta*. 2010 Jul 15;82(2):600-7.

- Hebert PDN** (1987) Genetics of *Daphnia*, in: Peters RH and Bernadi R. (Eds.), *Daphnia*. CNR, Pallanza, 245-284.
- Heckmann LH, Callaghan A, Hooper HL, Connon R, Hutchinson TH, Maund SJ, Sibly RM** (2007) Chronic toxicity of ibuprofen to *Daphnia magna*: effects on life history traits and population dynamics. *Toxicol Lett.* 2007 Aug;172(3):137-45.
- Hermann PM, Watson SN, Wildering WC** (2014) Phospholipase A2 - nexus of aging, oxidative stress, neuronal excitability, and functional decline of the aging nervous system? Insights from a snail model system of neuronal aging and age-associated memory impairment. *Front Genet.* 2014 Dec 4;5:419.
- Huang B, Sun W, Li X, Liu J, Li Q, Wang R, Pan X** (2015) Effects and bioaccumulation of 17beta-estradiol and 17alpha-ethynylestradiol following long-term exposure in crucian carp. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2015 Feb;112:169-76.
- Huezo CM** (1998) Current reversible contraceptive methods a global perspective. *Int. J. Gynecol. Obstet.* 1998 Aug;62 Suppl 1:S3-15.
- Hutchinson TH** (2002) Reproductive and developmental effects of endocrine disrupters in invertebrates: in vitro and in vivo approaches. *Toxicol Lett.* 2002 May 10;131(1-2):75-81.
- Idler DR, Wiseman P** (1972) Molluscan sterols: a review. *J. Fish. Res. Board Can.* 29:385-398.
- Imhof HK, Rusek J, Thiel M, Wolinska J, Laforsch C** (2017) Do microplastic particles affect *Daphnia magna* at the morphological, life history and molecular level? *PLoS One.* 2017 Nov 16;12(11):e0187590.
- Islam R, Richard MKY, Wayne AO'C, Thi KAT** (2020) Parental exposure to the synthetic estrogen 17a-ethinylestradiol (EE2) affects offspring development in the Sydney rock oyster, *Saccostrea glomerata*. *Environ Pollut.* 2020 Nov;266(Pt 1):114994.
- Ivashkin E, Khabarova MY, Melnikova V, Nezhlin LP, Kharchenko O, Voronezhskaya EE, Adameyko I** (2015) Serotonin mediates maternal effects and directs developmental and behavioral changes in the progeny of snails. *Cell Rep.* 2015 Aug 18;12(7):1144-58.
- Jakab G, Szalai Z, Michalkó G, Ringer M, Filep T, Szabó L, Maász G, Pirger Z, Ferincz Á, Staszny Á, Dobosy P, Kondor AC** (2020) Thermal baths as sources of pharmaceutical and illicit drug contamination. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2020 Jan;27(1):399-410.
- Janer G, Porte C** (2007) Sex steroids and potential mechanisms of non-genomic endocrine disruption in invertebrates. *Ecotoxicology.* 2007 Feb;16(1):145-60.
- Janse C, Slob W, Popelier CM, Vogelaar JW** (1988) Survival characteristics of the mollusc *Lymnaea stagnalis* under constant culture conditions: effects of aging and disease. *Mech Ageing Dev.* 1988 Mar;42(3):263-74.
- Jemec A, Drobne D, Tisler T, Trebse P, Ros M, Sepcic K** (2007) The applicability of acetylcholinesterase and glutathione S-transferase in *Daphnia magna* toxicity test. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2007 Jan;144(4):303-9.

- Jenkins RL, Wilson EM, Angus RA, Howell WM, Kirk M** (2003) Androstenedione and progesterone in the sediment of a river receiving paper mill effluent. *Toxicol Sci.* 2003 May;73(1):53-9.
- Jiang Q, Weili H** (2016) *Benefit-Risk Assessment Methods in Medical Product Development: Bridging Qualitative and Quantitative Assessments.* CRC Press. pp. 135–. ISBN 978-1-4822-5937-7.
- Kashian DR, Dodson SI** (2004) Effects of vertebrate hormones on development and sex determination in *Daphnia magna*. *Environ Toxicol Chem.* 2004 May;23(5):1282-8.
- Kemenes G, Elliot CJH, Benjamin PR** (1986) Chemical and tactile inputs to the *Lymnaea* feeding system: effects on behaviour and neural circuitry. *J Exp Biol.* 122:113–137.
- Ketata I, Denier X, Hamza-Chaffai A, Minier C** (2008) Endocrine-related reproductive effects in molluscs. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2008 Apr;147(3):261-70.
- Khargarot BS, Das S** (2010) Effects of copper on the egg development and hatching of a freshwater pulmonate snail *Lymnaea luteola* L. *J Hazard Mater.* 2010 Jul 15;179(1-3):665-75.
- Kim J, Park Y, Choi K** (2009) Phototoxicity and oxidative stress responses in *Daphnia magna* under exposure to sulfathiazole and environmental level ultraviolet B irradiation. *Aquat Toxicol.* 2009 Jan 18;91(1):87-94.
- Koene JM** (2010) Neuro-endocrine control of reproduction in hermaphroditic freshwater snails: mechanisms and evolution. *Front Behav Neurosci.* 2010 Oct 21;4:167.
- Kolodziej EP, Sedlak DL** (2007) Rangeland grazing as a source of steroid hormones to surface waters. *Environ Sci Technol.* 2007 May 15;41(10):3514-20.
- Kolpin DW, Furlong ET, Meyer MT, Thurman EM, Zaugg SD, Barber LB, Buxton HT** (2002) Pharmaceutical, hormones, and other organics wastewater contaminants in U.S. streams: a national reconnaissance. *Environ Sci Technol.* 2002 Mar 15;36(6):1202-11.
- Kondor AC, Jakab G, Vancsik A, Filep T, Szeberényi J, Szabó L, Maász G, Ferincz Á, Dobosy P, Szalai Z** (2020) Occurrence of pharmaceuticals in the Danube and drinking water wells: Efficiency of riverbank filtration. *Environ Pollut.* 2020 Oct;265(Pt A):114893.
- Kooijman S** (2000) *Dynamic energy and mass budgets in biological systems.* Cambridge University Press, Cambridge
- Kroupova HK, Trubiroha A, Lorenz C, Contardo-Jara V, Lutz I, Grabic R, Kocour M, Kloas W** (2014) The progestin levonorgestrel disrupts gonadotropin expression and sex steroid levels in pubertal roach (*Rutilus rutilus*). *Aquat Toxicol.* 2014 Sep;154:154-62.
- Kryukova NA, Yurlova NI, Rastyagenko NM, Antonova EV, Glupov VV** (2014) The influence of *Plagiorchis mutationis* larval infection on the cellular immune response of the snail host *Lymnaea stagnalis*. *J Parasitol.* 2014 Jun;100(3):284-7.

- Kuhl H, Jung-Hoffmann C, Wiegatz I** (1995). Gestodene-containing contraceptives. *Clin Obstet Gynecol.* 1995 Dec;38(4):829-40.
- Kumar V, Johnson AC, Trubiroha A, Tumová J, Ihara M, Grabic R, Kloas W, Tanaka H, Kroupová HK** (2015) The challenge presented by progestins in ecotoxicological research: a critical review. *Environ Sci Technol.* 2015 Mar 3;49(5):2625-38.
- Kuster M, de Alda L'p, Hernando MD, Petrovic M, Marti'n-Alonso J, Barcelo D** (2008) Analysis and occurrence of pharmaceuticals, estrogens, progestogens and polar pesticides in sewage treatment plant effluents, river water and drinking water in the Llobregat river basin (Barcelona, Spain). *J Hydrol* 358:112–123.
- Kunz PY, Fent K** (2009): Estrogenic activity of ternary UV filter mixtures in fish (*Pimephales promelas*) – an analysis with nonlinear isobolograms. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2009 Jan 1;234(1):77-88.
- Labadie P, Budzinski H** (2005) Determination of steroidal hormone profiles along the Jalle d'Eysines River (near Bordeaux, France). *Environ Sci Technol.* 2005 Jul 15;39(14):5113-20.
- Lazennec G, Thomas JA, Katzenellenbogen BS** (2001) Involvement of cyclic AMP response element binding protein (CREB) and estrogen receptor phosphorylation in the synergistic activation of the estrogen receptor by estradiol and protein kinase activators. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2001 Jun;77(4-5):193-203.
- Langeloh L, Seppa" la" O** (2018) Relative importance of chemical attractiveness to parasites for susceptibility to trematode infection. *Ecol Evol.* 2018 Aug 13;8(17):8921-8929.
- Langston WJ, Burt GR Chesman BS** (2007) Feminisation of male clams *Scrobicularia plana* from estuaries in Southwest UK and its induction by endocrinedisrupting chemicals. *Mar Ecol Prog Ser* 333:173–84.
- Le TH, Lim ES, Lee SK, Choi YW, Kim YH, Min J** (2010) Effects of glyphosate and methidathion on the expression of the Dhb, Vtg, Arnt, CYP4 and CYP314 in *Daphnia magna*. *Chemosphere.* 2010 Mar;79(1):67-71.
- LeBlanc ES, Laws A** (2000) Benefits and Risks of Third- Generation Oral Contraceptives. *J Gern Intern Med.* 1999 Oct;14(10):625-32.
- Levonorgestrel** (2020) - Drug Usage Statistics. ClinCalc. Retrieved.
- Linlan L, Xuexing D, Fu L, Yebin Y, Weihong Z, Fei L** (2016) Antioxidant enzymes responses of polychaete *Perinereis aibuhitensis* following chronic exposure to 17 β -estradiol. *Ital J Anim Sci.* 2016 15(3):552–557.
- Liu ZH, Ogejo JA, Pruden A, Knowlton KF** (2011) Occurrence, fate and removal of synthetic oral contraceptives (SOCs) in the natural environment: A review. *Sci Total Environ.* 2011 Nov 15;409(24):5149-61.
- Liu S, Ying GG, Zhao JI, Zhou LJ, Yang B, Chen ZF, Lai HJ** (2011) Occurrence and fate of androgens, estrogens, glucocorticoids and progestagens in two different types of municipal wastewater treatments plans. *J Environ Monit.* 2012 Feb;14(2):482-91.

- Liu S, Ying GG, Zhou L, Zhang RQ, Chen ZF, Lai HJ** (2012) Steroids in a typical swine farm and their release into the environment. *Water Res.* 2012 Aug;46(12):3754-68.
- Liu S, Ying GG, Liu S, Lai HJ, Chen ZF, Pan CG, Zhao JL, Chen J** (2014) Analysis of 21 progestagens in various matrices by ultrahigh- performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UHPLC–MS/MS) with diverse sample pretreatment. *Anal Bioanal Chem.* 2014 Nov;406(28):7299-311.
- Liu S, Ying GG, Liu YS, Yang YY, He LY, Chen J, Liu WR, Zhao JL** (2015) Occurrence and removal of progestagens in two representative swine farms: Effectiveness of lagoon and digester treatment. *Water Res.* 2015 Jun 15;77:146-154.
- Liu Y, Wang L, Pan B, Wang C, Bao S, Nie X** (2017) Toxic effects of diclofenac on life history parameters and the expression of detoxification-related genes in *Daphnia magna*. *Aquat Toxicol.* 2017 Feb;183:104-113.
- Lopez de Alda MJ, Gil A, Paz E, Barcelo D** (2002) Occurrence and analysis of estrogens and progestogens in river sediments by liquid chromatography–electrospray-mass spectrometry. *Analyst.* 2002 Oct;127(10):1299-304.
- Lukowiak K, Ringseis E, Spencer G, Wildering W, Syed N** (1996) Operant conditioning of aerial respiratory behaviour in *Lymnaea stagnalis*. *J Exp Biol.* 1996;199(Pt 3):683-91.
- Luna TO, Plautz SC, Salice CJ** (2015) Chronic effects of 17 α -ethinylestradiol, fluoxetine, and the mixture on individual and population-level end points in *Daphnia magna*. *Arch Environ Contam Toxicol.* 2015 May;68(4):603-11.
- Maász G, Zrinyi Z, Reglodi D, Petrovics D, Rivnyak A, Kiss T, Jungling A, Tamas A, Pirger Z** (2017) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) has a neuroprotective function in dopamine-based neurodegeneration in rat and snail parkinsonian models. *Dis Model Mech.* 2017 Feb 1;10(2):127-139.
- Maász G, Zrinyi Z, Takacs P, Lovas S, Fodor I, Kiss T, Pirger Z** (2017) Complex molecular changes induced by chronic progestogens exposure in roach, *Rutilus rutilus*. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2017 May;139:9-17.
- Maász G, Mayer M, Zrinyi Z, Molnar E, Kuzma M, Fodor I, Pirger Z, Takacs P** (2019) Spatiotemporal variations of pharmacologically active compounds in surface waters of a summer holiday destination. *Sci Total Environ.* 2019 Aug 10;677:545-555.
- Majumder A, Sanyal D** (2017) Outcome and preferences in male-to-female subjects with gender dysphoria: Experience from Eastern India. *Indian J Endocrinol Metab.* 2017 Jan-Feb;21(1):21-25.
- Markov GV, Gutierrez-Mazariegos J, Pitrat D, Billas IML, Bonneton F, Moras D, Hasserodt J, Lecointre G, Laudet V** (2017) Origin of an ancient hormone/receptor couple revealed by resurrection of an ancestral estrogen. *Sci Adv.* 2017 Mar 31;3(3):e1601778.
- Marchler-Bauer A, Bo Y, Han L, He J, Lanczycki CJ, Lu S, Chitsaz F, Derbyshire MK, Geer RC, Gonzales NR, Gwadz M, Hurwitz DI, Lu F, Marchler GH, Song JS, Thanki N, Wang Z, Yamashita RA, Zhang D, Zheng C, Geer LY, Bryant SH** (2017) CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures. *Nucleic Acids Res.* 2017 Jan 4;45(D1):D200-D203.

- Marois R** (1989) Embryonic development of *Lymnaea stagnalis*: General, neuronal and behavioral aspects. M.Sc. thesis, Dalhousie University, Halifax. Nova Scotia
- Marois R, Croll RP** (1991) Hatching asynchrony within the egg mass of the pond snail, *Lymnaea stagnalis*. *Invertebrate Reprod Dev.* 19(2):139–146.
- Martins J, Oliva Teles L, Vasconcelos V** (2007) Assays with *Daphnia magna* and *Danio rerio* as alert systems in aquatic toxicology. *Environ Int.* 2007 Apr;33(3):414-25.
- Matthiessen P, Gibbs PE** (1998) Critical appraisal of the evidence for tributyltin-mediated endocrine disruption in mollusks. *Environ Toxicol Chem.* 1998 17:37–43.
- Mescheriakov VN** (1990) Animal species for developmental studies. In: Detlaff DA, Vassetzky SCJ (Eds.) *The common pond snail, Lymnaea stagnalis*. (1st ed, old. 69-132) Plenum Press, New York- London
- Miracle A, Ankley G, Lattier D** (2006) Expression of two vitellogenin genes (vg1 and vg3) in fathead minnow (*Pimephales promelas*) liver in response to exposure to steroidal estrogens and androgens. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2006 Mar;63(3):337-42.
- Morill JB** (1982) Developmental biology of the freshwater invertebrates. In: Harrison FW, Cowden RR (Eds.), *Development of the pulmonate gastropod, Lymnaea*. (1 st ed, old. 399-483) New York
- Mörtl M, Vehovszky Á, Klátyik S, Takács E, Győri J, Székács A** (2020) Neonicotinoids: spreading, translocation and aquatic toxicity. *Int J Environ Res Public Health.* 2020 Mar 18;17(6):2006.
- Nakadera Y, Blom C, Koene JM** (2014) Duration of sperm storage in the simultaneous hermaphrodite *Lymnaea stagnalis*. *Journal of Molluscan Studies.* 80:1–7.
- Nakadera Y, Swart EM, Maas JP, Montagne- Wajer K, Ter Maat A, Koene JM** (2015) Effects of age, size, and mating history on sex role decision of a simultaneous hermaphrodite. *Behav Ecol.* 2015 Jan-Feb;26(1):232-241.
- Neale PA, Ait-Aissa S, BrackW, Creusot N, Denison MS, Deutschmann B, Hilscherová K, Hollert H, Krauss M, Novák J, Schulze T, Seiler TB, Serra H, Shao Y, Escher BI** (2015) Linking in vitro effects and detected organic micropollutants in surface Water Using Mixture- Toxicity Modeling. *Environ Sci Technol.* 2015 Dec 15;49(24):14614-24.
- Nieto A, Borrull F, Pocurull E, Marcé RM** (2010) Occurrence of pharmaceuticals and hormones in sewage sludge. *Environ Toxicol Chem.* 2010 Jul;29(7):1484-9.
- Núñez PE, Adema CM, de Jong-Brink M** (1994) Modulation of the bacterial clearance activity of haemocytes from the freshwater mollusc, *Lymnaea stagnalis*, by the avian schistosome, *Trichobilharzia ocellata*. *Parasitology.* 1994 Sep;109 (Pt 3):299-310.
- Ojogoro JO, Chaudhary AJ, Campo P, Sumpter JP, Scrimshaw MD** (2017) Progesterone potentially degrades to potent androgens in surface waters. *Sci Total Environ.* 2017 Feb 1;579:1876-1884.
- Orlando EF, Ellestad LE** (2014) Sources, concentrations, and exposure effects of environmental gestagens on fish and other aquatic wildlife, with an emphasis on reproduction. *Gen Comp Endocrinol.* 2014 Jul 1;203:241-9.

OECD (2012) Test No. 211: *Daphnia magna* reproduction test, OECD guidelines for the testing of chemicals, Section 2. OECD Publishing, Paris

OECD (2016) Test No. 243: *Lymnaea stagnalis* Reproduction Test (OECD Publishing)

Orsini L, Decaestecker E, De Meester L, Pfrender ME, Colbourne JK (2011) Genomics in the ecological arena. *Biol Lett.* 2011 Feb 23;7(1):2-3.

Pauwels B, Noppe H, De Brabander H, Verstraete W (2008) Comparison of steroid hormone concentrations in domestic and hospital wastewater treatment plants. *J Environ Eng. ASCE* 134(11):933–936.

Pereira JL, Hill CJ, Sibly RM, Bolshakov VN, Goncalves F, Heckmann LH, Callaghan A (2010) Gene transcription in *Daphnia magna*: effects of acute exposure to a carbamate insecticide and an acetanilide herbicide. *Aquat Toxicol.* 2010 May 5;97(3):268-76.

Petrovic M, Sole M, Lopez de Alda MJ, Barcelo D (2002) Endocrine disruptors in sewage treatment plants, receiving river waters, and sediments: integration of chemical analysis and biological effects on feral carp. *Environ Toxicol Chem.* 2002 Oct;21(10):2146-56.

Pirger Z, Crossley M, Laszlo Z, Naskar S, Kemenes G, O’Shea M, Benjamin PR, Kemenes I (2014) Interneuronal mechanism for Tinbergen’s hierarchical model of behavioral choice. *Curr Biol.* 2014 Sep 22;24(18):2215.

Pirger Z, Maász G, Takács P, Lovas S, Zrínyi Z, Svigruha R, Takátsy A, G-Tóth L, Avar P (2015) Humán eredetű szteroid szennyezések kimutatása a Balaton és a Zala vízgyűjtőjén HPLC MS/MS analitikai módszerrel. *Hidrológiai Közlöny.*

Pirger Z, Zrínyi Z, Maász G, Molnar E, Kiss T (2018) Pond snail reproduction as model in the environmental risk assessment: reality and doubts. In: Raj S (ed) *Biological resources of water.* IntechOpen, Croatia, pp 33–53.

Pirger Z, László Z, Naskar S, O’Shea M, Benjamin PR, Kemenes G, Kemenes I (2021) Interneuronal mechanisms underlying a learning-induced switch in a sensory response that anticipates changes in behavioural outcomes. *Curr Biol.* 2021 Apr 26;31(8):1754-1761.e3.

Postigo C, Lopez de Alda MJ, Barcelo D (2010) Drugs of abuse and their metabolites in the Ebro River basin: occurrence in sewage and surface water, sewage treatment plants removal efficiency, and collective drug usage estimation. *Environ Int.* 2010 Jan;36(1):75-84.

Pu C, Wu YF, Yang H, Deng AP (2008) Trace analysis of contraceptive drug levonorgestrel in wastewater samples by a newly developed indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) coupled with solid phase extraction. *Anal Chim Acta.* 628:73–79.

Qiao YW, Yang H, Wang B, Song J, Deng AP (2009) Preparation and characterization of an immunoaffinity chromatography column for the selective extraction of trace contraceptive drug levonorgestrel from water samples. *Talanta.* 2009 Nov 15;80(1):98-103.

Raven CP (1958) *Morphogenesis: the analysis of molluscan development.* Eds.: Harris J.E. and Yemm E.W. Pergamon Press London, New York, Paris, Los Angeles

- Ravina E** (2011) *The Evolution of Drug Discovery: From Traditional Medicines to Modern Drugs*. John Wiley & Sons. pp. 193–. ISBN 978-3-527-32669-3.
- Ren J, Chung-Davidson YW, Jia L, Li W** (2019) Genomic sequence analyses of classical and non-classical lamprey progesterone receptor genes and the inference of homologous gene evolution in metazoans. *BMC Evol Biol.* 2019 Jul 1;19(1):136.
- Richardson ML, Bowron JM** (1985) The fate of pharmaceutical chemicals in the aquatic environment. *J Pharm Pharmacol.* 1985 Jan;37(1):1-12.
- Rodríguez EM, Medesani DA, Fingerman M** (2007) Endocrine disruption in crustaceans due to pollutants: a review. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2007 Apr;146(4):661-71.
- Rosenfeld CS, Denslow ND, Orlando EF, Gutierrez-Villagomez JM, Trudeau VL** (2017) Neuroendocrine disruption of organizational and activational hormone programming in poikilothermic vertebrates. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* 2017;20(5):276-304.
- Roy S, Mishell DR, Gray G, Dozono-Takano R, Brenner PF, Eide I, Shaw ST** (1980): Comparison of metabolic and clinical effects of four oral contraceptive formulations and a contraceptive vaginal ring. *Am J Obstet Gynecol.* 1980 Apr 1;136(7):920-31.
- Runnalls TJ, Beresford N, Losty E, Scott AP, Sumpter JP** (2013) Several synthetic progestins with different potencies adversely affect reproduction of fish. *Environ Sci Technol.* 2013 Feb 19;47(4):2077-84.
- Runnalls TJ, Beresford N, Kugathas S, Margiotta-Casaluci L, Scholze M, Scott AP, Sumpter JP** (2015) From single chemicals to mixtures – reproductive effects of levonorgestrel and ethinylestradiol on the fathead minnow. *Aquat Toxicol.* 2015 Dec;169:152-67.
- Sadamoto H, Sato H, Kobayashi S, Murakami J, Aonuma H, Ando H, Fujito Y, Hamano K, Awaji M, Lukowiak K, Urano A, Ito E** (2004) CREB in the pond snail *Lymnaea stagnalis*: cloning, gene expression, and function in identifiable neurons of the central nervous system. *J Neurobiol.* 2004 Mar;58(4):455-66.
- Safholm M, Jansson E, Fick J, Berg C** (2015): Mixture effects of levonorgestrel and ethinylestradiol: estrogenic biomarkers and hormone receptor mRNA expression during sexual programming. *Aquat Toxicol.* 2015 Apr;161:146-53.
- Sakr AA, Osman GY, Abo-Shafey AE** (1992) Effect of testosterone on the ovotestis of the land snail *Theba pisana*. *Funct Dev Morphol.* 1992;2(2):99-101.
- Salanki J, Farkas A, Kamardina T, Rozsa KS** (2003) Molluscs in biological monitoring of water quality. *Toxicol Lett.* 2003 Apr 11;140-141:403-10.
- Scott AP** (2012) Do mollusks use vertebrate sex steroids as reproductive hormones? Part I: Critical appraisal of the evidence for the presence, biosynthesis and uptake of steroids. *Steroids.* 2012 Nov;77(13):1450-68.
- Scott AP** (2018) Is there any value in measuring vertebrate steroids in invertebrates? *Gen Comp Endocrinol.* 2018 Sep 1;265:77-82.

- Shen X, Chang H, Sun D, Wang L, Wu F** (2018) Trace analysis of 61 natural and synthetic progestins in river water and sewage effluents by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Water Res.* 2018 Apr 15;133:142-152.
- Sidorkiewicz I, Zareba K, Wolczynski S, Czerniecki J** (2017) Endocrine-disrupting chemicals mechanisms of action on male reproductive system. *Toxicol Ind Health.* 2017 Jul;33(7):601-609.
- Sitruk-Ware R, Nath A** (2010) The use of newer progestins for contraception. *Contraception.* 2010 Nov;82(5):410-7.
- Skála V, Walker AJ, Hora' k P** (2020) Snail defence responses to parasite infection: the *Lymnaea stagnalis-Trichobilharzia szidati* model. *Dev Comp Immunol.* 2020 Jan;102:103464.
- Snyder SA, Westerhoff P, Yoon Y, Sedlak DL** (2003) Pharmaceuticals, personal care products, and endocrine disruptors in water: implications for the water industry. *Environ Eng Sci.* 2003; 20:449-469.
- Stephenson R, Lewis V** (2011) Behavioural evidence for a sleep-like quiescent state in a pulmonate mollusc, *Lymnaea stagnalis* (Linnaeus). *J Exp Biol.* 2011 Mar 1;214(Pt 5):747-56.
- Stollewerk A** (2010) The water flea *Daphnia* - a 'new' model system for ecology and evolution? *J Biol.* 2010;9(2):21.
- Sumpter JP, Jobling S** (1995) Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environ Health Perspect.* 1995 Oct;103 Suppl 7(Suppl 7):173-8.
- Svgruha R, Fodor I, Padisák J, Pirger Z** (2020) Progestogen-induced alterations and their ecological relevance in different embryonic and adult behaviours of an invertebrate model species, the great pond snail (*Lymnaea stagnalis*). *Environ Sci Pollut Res Int.* 2020 Dec 21. doi: 10.1007/s11356-020-12094-z.
- Svgruha R, Fodor I, Győri J, Schmidt J, Padisák J, Pirger Z** (2021) Effects of chronic sublethal progestogen exposure on development, reproduction, and detoxification system of water flea, *Daphnia magna*. *Sci Total Environ.* 2021 Aug 25;784:147113.doi: 0.1016/j.scitotenv.2021.147113.
- Szentágothai J, Réthelyi M** (1989) *Funkcionális Anatómia, Medicina Kiadó, 1989*
- Takeda N** (1980) Hormonal control of head-wart development in the snail, *Euhadra peliomphala*. *J Embryol Exp Morphol.* 1980 Dec;60:57-69.
- Teles M, Pacheco M, Santos MA** (2005) *Sparus aurata* L. liver EROD and GST activities, plasma cortisol, lactate, glucose and erythrocytic nuclear anomalies following short-term exposure either to 17β-estradiol (E2) or E2 combined with 4- nonylphenol. *Sci. Total Environ.* 2005 Jan 5;336(1-3):57-69.
- Ten Berge WF** (1978) Breeding of *Daphnia magna*. *Hydrobiologia* 59:121–123.
- Ter Maat A, Pieneman AW, Koene JM** (2012) The effect of light on induced egg laying in the simultaneous hermaphrodite *Lymnaea stagnalis*. *J Molluscan Stud.* 78:262–267.
- Thrupp TJ, Runnalls TJ, Scholze M, Kugathas S, Kortenkamp A, Sumpter JP** (2018) The consequences of exposure to mixtures of chemicals: something from

'nothing' and 'a lot from a little' when fish are exposed to steroid hormones. *Sci Total Environ.* 2018 Apr 1;619-620:1482-1492.

Tillmann M, Schulte-Oehlmann U, Duft M, Markert B, Oehlmann J (2001) Effects of endocrine disruptors on prosobranch snails (Mollusca: Gastropoda) in the laboratory. Part III: cyproterone acetate and vinclozolin as antiandrogens. *Ecotoxicology.* 2001 Dec;10(6):373-88.

Torres NH, Aguiar MM, Ferreira LF, Americo JH, Machado AM, Cavalcanti EB, Tornisielo VL (2015) Detection of hormones in surface and drinking water in Brazil by LC-ESI-MS/MS and ecotoxicological assessment with *Daphnia magna*. *Environ Monit Assess.* 2015 Jun;187(6):379.

Tosti E, Di Cosmo A, Cuomo A, Di Cristo C, Gragnaniello G (2001) Progesterone induces activation in *Octopus vulgaris* spermatozoa. *Mol Reprod Dev.* 2001 May;59(1):97-105.

Trac LN, Andersen O, Palmqvist A (2016) Deciphering mechanisms of malathion toxicity under pulse exposure of the freshwater cladoceran *Daphnia magna*. *Environ Toxicol Chem.* 2016 Feb;35(2):394-404.

Tran TKA, Yu RMK, Islam R, Nguyen THT, Bui TLH, Kong RYC, O'Connor WA, Leusch FDL, Andrew-Priestley M, MacFarlane GR (2019) The utility of vitellogenin as a biomarker of estrogenic endocrine disrupting chemicals in molluscs. *Environ Pollut.* 2019 May;248:1067-1078.

Vandenberg LN, Colborn T, Hayes TB, Heindel JJ, Jacobs DR Jr, Lee DH, Shioda T, Soto AM, vom Saal FS, Welshons WV, Zoeller RT, Myers JP (2012) Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocr Rev.* 2012 Jun;33(3):378-455.

Varaksina GS, Varaksin AA, Maslennikova LA (1992) Role of sex steroid hormones in spermatogenesis of the scallop *Mizuhopecten yessoensis*. *Biol Morya-Vlad.* 1–2:77–83.

Velicu M, Suri R (2009) Presence of steroid hormones and antibiotics in surface water of agricultural, suburban and mixed-use area. *Environ Monit Assess.* 2009 Jul;154(1-4):349-59.

Viglino L, Aboufadi K, Prevost M, Sauve S (2008) Analysis of natural and synthetic estrogenic endocrine disruptors in environmental waters using online preconcentration coupled with LC-APPI-MS/MS. *Talanta.* 2008 Sep 15;76(5):1088-96.

Voronezhskaya EE, Hiripi L, Elekes K, Croll RP (1999) Development of catecholaminergic neurons in the pond snail, *Lymnaea stagnalis*: I. Embryonic development of dopamine-containing neurons and dopamine-dependent behaviors. *J Comp Neurol.* 1999 Feb 15;404(3):285-96.

Vorontsova YL, Slepneva IA, Yurlova NI, Ponomareva NM, Glupov VV (2019) The effect of trematode infection on the markers of oxidative stress in the offspring of the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. *Parasitol Res.* 2019 Dec;118(12):3561-3564.

Vulliet E, Baugros JB, Flament-Waton MM, Grenier-Loustalot MF (2007) Analytical methods for the determination of selected steroid sex hormones and corticosteroids in wastewater. *Anal Bioanal Chem.* 2007 Mar;387(6):2143-51.

- Vulliet E, Cren-Olivé C** (2011) Screening of pharmaceuticals and hormones at the regional scale, in surface and groundwaters intended to human consumption. *Environ Pollut.* 2011 Oct;159(10):2929-34.
- Vulliet E, Wiest L, Baudot R, Grenier-Loustalot MF** (2008) Multi-residue analysis of steroids at sub-ng/L levels in surface and ground-waters using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2008 Nov 7;1210(1):84-91.
- Wang C, Croll RP** (2003) Effects of sex steroids on in vitro gamete release in the sea scallop, *Placoplecten magellanicus*. *Invert Reprod De.* 44:89–100.
- Wang L, Peng Y, Nie X, Pan B, Ku P, Bao S** (2016) Gene response of CYP360A, CYP314, and GST and whole-organism changes in *Daphnia magna* exposed to ibuprofen. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2016 Jan;179:49-56.
- Watson SN, Wright N, Hermann PM, Wildering WC** (2013) Phospholipase A₂: the key to reversing long-term memory impairment in a gastropod model of aging. *Neurobiol Aging.* 2013 Feb;34(2):610-20.
- Whitehead M** (2006) Hormone replacement therapy with estradiol and drospirenone: an overview of the clinical data. *J Br Menopause Soc.* 2006 Mar;12 Suppl 1:4-7.
- Wick RR, Judd LM, Holt KE** (2018) Deepbiner: Demultiplexing barcoded Oxford Nanopore reads with deep convolutional neural networks. *PLoS Comput Biol.* 2018 Nov 20;14(11):e1006583.
- Woo S, Won H, Lee A, Yum S** (2012) Oxidative stress and gene expression in diversetissues of *Oryzias javanicus* exposed to 17 β -estradiol. *Mol Cell Toxicol.* 8:263–269.
- Yang YY, Gray JL, Furlong ET, Davis JG, ReVello RC, Borch T** (2012) Steroid hormone runoff from agricultural test plots applied with municipal biosolids. *Environ Sci Technol.* 012 Mar 6;46(5):2746-54.
- Ying GG, Kookana RS, Kolpin DW** (2009) Occurrence and removal of pharmaceutically active compounds in sewage treatment plants with different technologies. *J Environ Monit.* 2009 Aug;11(8):1498-505.
- Yoo J, Hur J, Jung J** (2019) Identification of oxidative stress and estrogenic activity induced by polarity fractions of effluent organic matter. *J Hazard Mater.* 2019 Aug 5;375:264-272.
- Yost EE, Meyer MT, Dietze JE, Williams CM, Worley-Davis L, Lee B, Kullman SW** (2014) Transport of steroid hormones, phytoestrogens, and estrogenic activity across a swine lagoon/sprayfield system. *Environ Sci Technol.* 2014 Oct 7;48(19):11600-9.
- Yu M, Wang SH, Luo YR, Han YW, Li XY, Zhang BJ, Wang JJ** (2009) Effects of the 1-alkyl-3-methylimidazolium bromide ionic liquids on the antioxidant defense system of *Daphnia magna*. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2009 Sep;72(6):1798-804.
- Zeilinger J, Steger-Hartmann T, Maser E, Goller S, Vonk R, Länge R** (2009) Effects of synthetic gestagens on fish reproduction. *Environ Toxicol Chem.* 2009 Dec;28(12):2663-70.

- Zhang P, Blonk BA, van den Berg RF, Bakker ES** (2018) The effect of temperature on herbivory by the omnivorous ectotherm snail *Lymnaea stagnalis*. *Hydrobiologia* 812:147–155.
- Zheng Y, Yuan J, Gu Z, Yang G, Li T, Chen J** (2020) Transcriptome alterations in female *Daphnia* (*Daphnia magna*) exposed to 17 β -estradiol. *Environ Pollut.* 2020 Jun;261:114208.
- Zonneveld C, Kooijman S** (1989) Application of a Dynamic Energy Budget Model to *Lymnaea stagnalis* (L.). *Funct Ecol.* 3(3):269–278.
- Zou E, Fingerman M** (1997) Effects of estrogenic xenobiotics on molting of the water flea, *Daphnia magna*. *Ecotoxicol Environ Saf.* 1997 Dec;38(3):281-5.
- Zrínyi Z** (2017) Fogamzástgató hatóanyag- maradványok által kiváltott szomatikus és molekuláris változások gerinctelen és gerinces vízi tesztállatokon. PhD értekezés, BLKI, Tihany
- Zrínyi Z, Maász G, Zhang L, Vertes A, Lovas S, Kiss T, Elekes K, Pirger Z** (2017) Effect of progesterone and its synthetic analogs on reproduction and embryonic development of a freshwater invertebrate model. *Aquat Toxicol.* 2017 Sep;190:94-103.
- Zucchi S, Mirbahai L, Castiglioni S, Fent K** (2014) Transcriptional and physiological responses induced by binary mixtures of drospirenone and progesterone in zebrafish (*Danio rerio*). *Environ Sci Technol.* 2014 Mar 18;48(6):3523-31.

10. TUDOMÁNYOS TEVÉKENYSÉG ADATAI

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ MAGYAR ÉS IDEGEN NYELVŰ KÖZLEMÉNYEK

Svigruha R, Fodor I, Győri J, Schmidt J, Padisák J, Pirger Z (2021) Effects of chronic sublethal progestogen exposure on development, reproduction, and detoxification system of water flea, *Daphnia magna*. *Science of the Total Environment*. (D1; IF: 7.89)

Svigruha R; Fodor I; Padisák J; Pirger Z (2020) Progestogen-induced alterations and their ecological relevance in different embryonic and adult behaviours of an invertebrate model species, the great pond snail (*Lymnaea stagnalis*) *Environmental Science And Pollution Research*. (Q2; IF: 4.223)

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁHOZ KÖZVETLENÜL NEM KAPCSOLÓDÓ EGYÉB KÖZLEMÉNYEK

Fodor I, **Svigruha R**, Bozso Z, Toth G, Osugi T, Yamamoto T, Satake H, Pirger Z (2021) Functional characterization of invertebrate gonadotropin-releasing hormone/corazonin neuropeptide in the great pond snail (*Lymnaea stagnalis*). *Scientific Reports* 11(1):10028 (D1; IF: 4.37)

Fodor I, **Svigruha R**, Kemenes G, Kemenes I, Pirger Z (2021) The great pond snail (*Lymnaea stagnalis*) as a model of ageing and age-related memory impairment: an overview. *The Journals of Gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*. doi: 10.1093/gerona/glab014.(D1; IF: 6.053)

Molnar E, Fodor I, **Svigruha R**, Pirger Z (2021) : Issues, challenges, directives, and limitations concerning the improvement of environmental risk assessment of pharmaceutically active compounds. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 216: pp. 112212.(Q1; IF 4.872)

Avar P; Maász G; Takács P; Lovas S; Zrinyi Z; **Svigruha R**; Takátsy A; Tóth LG; Pirger Z (2016) HPLC-MS/MS analysis of steroid hormones in environmental water samples. *Drug Testing And Analysis*. 8: 1 pp. 123-127., 5 p. (Q1; IF: 3.345)

Pirger Z; Maász G; Takács P; Lovas S; Zrinyi Z; **Svigruha R**; Takátsy A; G.-Tóth L; Avar PÁ (2015) Humán eredetű szteroid szennyezések kimutatása a Balaton és a Zala vízgyűjtőjén HPLC MS/MS analitikai módszerrel = Detection of anthropogenic steroid contaminations in catchment area of Zala River and Lake Balaton by HPLC MS/MS method *Hidrológiai Közlöny* 95: 5-6 pp.68-72.5 p.

Takács P; **Svigruha R**; Horváth J; Czeglédi I; Bíró P (2014) Halastavak kisvízfolyásokra gyakorolt rövidtávú hatásainak bemutatása egy balatoni befolyó példáján *Hidrológiai Közlöny* 94: 5-6 pp. 93-96., 4 p.

Pirger Z; Takács P; Bévárdi N; **Svigruha R**; Maász G; Avar P (2014) Humán eredetű szteroid terhelés. *Biokontroll*. 5: 2 pp. 76-77,2 p.

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ MAGYAR ÉS IDEGEN NYELVŰ PREZENTÁCIÓK

Sviruha R, Fodor I, Padisák Judit, Pirger Zsolt (2020) Progesztogén- okozta változások és azok ökológiai relevanciája vízi gerinctelen modellállatok embrióiban és felnőtt egyedeiben. Pannon tudományos Nap, 2020. (**online előadás**)

Svigruha R, Fodor I, Padisák J, Pirger Zs (2020) Progesztogének okozta változások és azok ökológiai vonatkozásai egy vízi gerinctelen modellállat (*Lymnaea stagnalis*) embrióiban és felnőtt egyedeiben. X. Ökotoxikológiai konferencia, 2020. (**online poszter**)

Svigruha R (2020) Gerinctelen vízi modell állatokban megfigyelhető változások progesztogén hatóanyagok hosszútávú terhelése során. Új Nemzeti Kiválóság Program Intézményi Konferencia. 2020. (**online előadás**)

Svigruha R (2019) Gerinctelen vízi modell állatokban megfigyelhető változások progesztogén hatóanyagok hosszútávú terhelése során. Intézeti Napok, Tihany, 2019. (**előadás**)

Svigruha R, Z. Zrínyi Z, Fodor I, Maász G, Pirger Z (2019) Impact of progestogens contaminations on the development of zooplankton and aquatic invertebrate species; 17th International Conference on Chemistry and the Environment, Thessaloniki, Görögország. 2019. (nemzetközi **poszter**)

Svigruha R, Z. Zrínyi, I. Fodor, G. Maász, S. Lovas, Z. Pirger (2019) Impact of progestogen contaminations on the general physiological state of *Lymnaea stagnalis*. 1st Symposium on Invertebrate Neuroscience, Tihany, 2019. (nemzetközi **poszter**) <http://epostersystem.com/sin/sin.htm>

Svigruha R (2019) Impact of progestogen contaminations on the general physiological state of *Lymnaea stagnalis*. 1st Symposium on Invertebrate Neuroscience, Tihany, 2019. (nemzetközi **előadás**) <http://epostersystem.com/sin/sin.htm>

Svigruha R (2018) Gerinctelen vízi modell állatokban megfigyelhető változások progesztogén hatóanyagok hosszútávú terhelése során. I.Régiós Környezettoxikológiai PhD Konferencia, Veszprém. 2018. (**előadás**)

Svigruha R, Z. Zrínyi, Z. Pirger (2018) Impact of antropogenic hormone contaminations on the development of zooplankton and aquatic invertebrate species. Magyar Tudományos Akadémia Veszprémi Területi Bizottság Környezettoxikológiai Munkabizottság előadóülése, Veszprém, 2018. (**előadás**)

Svigruha R; Zrínyi Z; Fodor I; Kardos V; G-Tóth L; Pirger Z (2018) Gerinctelen vízi modellállatokban megfigyelhető változások progesztogén hatóanyagok hosszútávú terhelése során. In: Darvas, Béla VIII. Ökotoxikológiai Konferencia előadás és poszter kötete Budapest, Magyarország: Magyar Ökotoxikológiai Társaság, pp. 35-36., 2 p. 2018. (**poszter**) ISBN:978-963-89452-9-7

Svigruha R, Zrínyi Z, Pirger Z (2018) Emberi eredetű hormonszennyezések hatása a zooplankton és a vízi makrogerinctelen szervezetek fejlődésére. MTA ÖK BLI, Intézeti Napok, Tihany, 2018. (**előadás**)

Svigruha R, Zrínyi Z, Pirger Z (2017) Emberi eredetű hormonszennyezések hatása a vízi zooplankton és makrogerinctelen szervezetekre. LIX. Hidrobiológus Napok, Tihany, 2017. (előadás)

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁHOZ KÖZVETLENÜL NEM KAPCSOLÓDÓ EGYÉB PREZENTÁCIÓK

Fodor I; **Svigruha R**; Molnár É; Urbán P; Joris MK; Pirger Z (2020) Progesztogének indukálta hatások a nagy mocsári csiga (*Lymnaea stagnalis*) neuroendokrin és reprodukciós rendszerében. X. Ökotoxikológiai konferencia 2: 2 pp. 9-10., 2 p. 2020. (online előadás)

Maász G, Fodor I, Molnár É, Zrínyi Z, **Svigruha R**, Udvardi R, László Z, Kiss T, Pirger Z (2020) Monitoring of environmental psychoactive drug contaminations and investigation of the induced neuronal changes. IBRO Workshop, Szeged, Hungary, 2020. (nemzetközi poszter)

Fodor I, Zrínyi Z, **Svigruha R**, Urbán P, Tsai PS, Koene JM, Pirger Zs (2020) Effects of progestogens on the neuroendocrine system of an invertebrate model species (*Lymnaea stagnalis*). NAEM, Lunteren, the Netherlands, 2020. (nemzetközi poszter)

Fodor I, Zrínyi Z, **Svigruha R**, Urbán P, Tsai PS, Koene JM, Pirger Z (2020) Effects of progestogens on the neuroendocrine system of an invertebrate model species (*Lymnaea stagnalis*). Scientific day of VU, Amsterdam, the Netherlands. 2020. (nemzetközi előadás)

Pirger Z, **Svigruha R**, Urbán P, Tsai PS, Koene JM, Fodor I (2020) Identification, presence, and possible multifunctional regulatory role of invertebrate GnRH/CRZ molecule in the great pond snail (*Lymnaea stagnalis*). FENS Virtual Forum, 2020. (nemzetközi online poszter)

Fodor I, Zrínyi Z, **Svigruha R**, Molnár É, Urbán P, Tsai PS, Koene JM, Pirger Z (2020) Effects of progestogens on the neuroendocrine system of an invertebrate model species (*Lymnaea stagnalis*). IBRO Workshop, Szeged, Hungary, 2020. (nemzetközi poszter)

Pirger Z; Fodor, I; **Svigruha R**; Molnár É; Zrínyi Z; Kiss T; Maász G (2019) Környezeti kockázatbecslés alapján beállított gyógyszerszennyezések élettani hatásai nagy mocsári csigán (*Lymnaea stagnalis*) In: Darvas, Béla; Pirger, Zsolt; Székács, András (szerk.) IX. Ökotoxikológiai Konferencia előadás és poszter kötete Budapest, Magyarország: Magyar Ökotoxikológiai Társaság, p. 19. 2019. (előadás) ISBN 978-615-81449-0-2

Maász G; Fodor I; Molnár É; Zrínyi Z; **Svigruha R**; Kiss T; Pirger Z (2019) A környezetből kimutatható pszichoaktív hatóanyagszennyezések felmérése és az általuk indukált változások vizsgálata a nagy mocsári csiga (*Lymnaea stagnalis*) központi idegrendszerében In: Darvas, Béla; Pirger, Zsolt; Székács, András (szerk.) IX. Ökotoxikológiai Konferencia előadás és poszter kötete Budapest, Magyarország: Magyar Ökotoxikológiai Társaság, p. 16. 2019. (poszter) ISBN 978-615-81449-0-2

Svigruha R; Fodor I; Maász G; Szoboszlai S; Bordós G; Pirger Z (2019) Jelölt mikroműanyag-partikulumok mozgása a nagy vízibolha nemzedékei között In: Darvas, Béla; Pirger, Zsolt; Székács, András (szerk.) IX. Ökotoxikológiai Konferencia előadás és poszter kötete Budapest, Magyarország: Magyar Ökotoxikológiai Társaság, p. 23. 2019. (poszter) ISBN 978-615-81449-0-2

G. Maász, I. Fodor, E. Molnar, Z. Zrínyi, **Svigruha R.**, R. Udvardi, Z. Laszlo, T. Kiss, Z. Pirger (2019) Monitoring of environmental psychoactive drug contaminations and investigation of the induced neuronal changes. 1st Symposium on Invertebrate Neuroscience, Tihany, 2019. (nemzetközi **poszter**) <http://epostersystem.com/sin/sin.htm>

Fodor I; **Svigruha R.**; Zrínyi Z; Büki G; Urbán P; Pirger Z (2018) Gonadotropin-felszabadító hormon (GnRH) expresszióvizsgálata progesztogénkezelt nagy mocsári csiga (*Lymnaea stagnalis*) központi idegrendszerében In: Darvas, Béla VIII. Ökotoxikológiai Konferencia előadás és poszter kötete Budapest, Magyarország: Magyar Ökotoxikológiai Társaság, p. 9 2018. (**poszter**)

Maász G.; Takács, P; Boda P; **Svigruha R.**; Várbíró G.; Pirger Z (2018) Tömegspektrometrián alapuló faji és nemi elkülönítés In: A XIV. Magyar Haltani Konferencia. 2018. (**előadás**) ISBN 978-615-00-1139-4

Avar P; Maász G; Takács P; Lovas S; Zrínyi Z; **Svigruha R.**; Takátsy A; G -Tóth L; Pirger Z (2015) Sztteroid szennyezők tömegspektrometriás vizsgálata a Balaton vízgyűjtő területén In: Magyar, Kémikusok Egyesülete Környezetvédelmi Analitikai és Technológiai Társaság (szerk.) XII. Környezetvédelmi analitikai és technológia konferencia: a jelen és a jövő analitikai eljárásai és technológiái az egészséges emberi környezetért. Balatonszárszó, Magyarország: Magyar Kémikusok Egyesülete (MKE), 2015.(**előadás**) ISBN:978-963-9970-58-8

Pirger Z; Takács P; Bévárdi N; **Svigruha R.**; Maász G; Avar P (2014) Humán eredetű sztteroid terhelés és annak lehetséges élettani hatásai a Balaton és a Zala vízgyűjtőjén. In: Darvas, Béla; Bakonyi, Gábor; Barna, Szilvia; Major, Jenő; Sebestyén, István; Székács, András; Vehovszky, Ágnes (szerk.) IV. Ökotoxikológiai Konferencia: előadás és poszter kötete. Budapest, Magyarország: Magyar Ökotoxikológiai Társaság, pp.28-29.,2 p.; 2014. (**előadás**) ISBN:978-963-89452-4-2

11 EREDMÉNYEK TÉZISSZERŰ ÖSSZEFOGLALÁSA

A doktori értekezésben bemutatott kísérletek célkitűzése az volt, hogy megvizsgáljuk, hogy a detektált progesztogén típusú hatóanyagok milyen szinteken és mértékben, továbbá, milyen lehetséges jelátviteli útvonalakon keresztül befolyásolják nagy mocsári csiga (*Lymnaea stagnalis*) valamint a nagy vízibolha (*Daphnia magna*) élettani folyamatait. A disszertációban bemutatott vizsgálat volt az első olyan, amelyben a progesztogének hatását keverékben (progeszteron, levonorgesztrell, drospirenon, gesztodén), környezetileg is releváns átlagos koncentrációkban (1 és 10 ng L⁻¹), továbbá extrém magas (100 és 500 ng L⁻¹) koncentrációkban tanulmányoztuk.

Erre vonatkozóan a tudományos eredmények a következők:

11.1 A kezelések hatása a csigaembriók fejlődésére

11.1.1 A krónikus progesztogén kezelések *L. stagnalis* embrionális fejlődésére gyakorolt hatásának eredményeiről megállapítottuk, hogy minden kezelt csoportban az izolált megtermékenyített petesejtek közvetlen kezelése gyorsabb kikelést eredményezett. A 13. napon, a kikelés dinamikája szignifikánsan nőtt a 10 és 100 ng L⁻¹-es kezelt csoportokban. A 14. napra a legtöbb embrió már kikelt a kezelések hatására (1 ng L⁻¹: 9/10; 10 ng L⁻¹: 10/10; 100 ng L⁻¹: 10/10; 500 ng L⁻¹: 10/10), szignifikáns növekedést mutatva a kontroll csoporttal (átlagosan 5/10) szemben. A kikelés dinamikáján kívül megfigyeltük (5 nap) a hólyagszem pigmentációjának megjelenését a 10 és a 100 ng L⁻¹ -es kezelt csoport egyedeiben, a kontroll csoporthoz képest. Megfigyeltük, hogy a 100 ng L⁻¹ -es kezelt csoport egyedeiben a 84., a 10 ng L⁻¹-es csoport egyedeiben pedig a 96. órában megjelennek a hólyagszemek a kontroll egyedeihez képest.

11.2 Az embrionális viselkedési formákban megfigyelt változások

11.2.1 Megfigyeltük a progesztogén kezelések hatására kialakuló szívfrekvencia változásokat az E65-75%-os fejlettségű embriókon. Az eredmények azt mutatták, hogy nem volt szignifikáns különbség a szívritmus változásában a kontroll és az 1 ng L⁻¹-es csoportok között, azonban a 10, 100 és 500 ng L⁻¹ -es kezelt csoportok egyedei szignifikánsan magasabb pulzusszámot mutattak. Az embriók intrakapszulláris térben vizsgált csúszó mozgásának kumulatív száma az összes kezelt csoportban szintén szignifikánsan megnövekedett a kontrollhoz viszonyítva. Az embriók fiktív táplálkozásának változásáról (*radula* öltögetések száma) megállapítottuk, hogy az első három megfigyelési napon nem volt szignifikáns különbség a kontroll és a 10, 100 és 500

ng L⁻¹ kezelt csoportok között. Ugyanakkor a 13. embrionális naptól kezdve a *radula* öltögetések száma szignifikánsan emelkedett ezekben a kezelt csoportokban.

11.3 A felnőtt csigák mozgási és táplálkozási aktivitása

11.3.1 Kísérleteink alapján a krónikus progesztogén kezelések a felnőtt csigák mozgási és táplálkozási aktivitását is jelentősen befolyásolták. Az 1, illetve 10 ng L⁻¹ progesztogén keverékkel kezelt csoport egyedei átlagosan rövidebb távolságot tettek meg mint, a kontroll csoport egyedei, tehát szignifikánsan csökkent a mozgási aktivitásuk. Ezzel szemben szignifikáns növekedést figyeltünk meg a 100 ng L⁻¹-es kezelt csoportok esetében a kontroll csoport mért értékeihez képest. Az 500 ng L⁻¹-es csoport mozgási aktivitása nem mutatott szignifikáns különbséget. A táplálkozási aktivitás esetében ezzel ellentétes változásokat figyeltünk meg. A kontroll csoporthoz képest az 1 ng L⁻¹-es kezelt csoport egyedeinek az átlagos harapás száma látszólag megnövekedett, de ez nem volt szignifikáns eltérés. Ugyanakkor a 10 ng L⁻¹ progesztogénnel kezelt felnőtt állatok esetében már szignifikáns volt az eltérés. A 100 és 500 ng L⁻¹ csoport egyedeinél pedig ugyanez szignifikáns csökkenést eredményezett a kontrollhoz képest.

11.4 Azonosított stressz-aktivált protein kinázok és celluláris változások a központi idegrendszerben

11.4.1 Sikeresen azonosítottuk a metabolikus és környezeti stressz-indukált celluláris válaszokban szerepet játszó kulcsmolekulákat (p38alpha és JNK1). Megvizsgáltuk, hogy más ismert stresszmarkerekkel együtt (pl. DJ-1) hogyan változott a mennyiségük a hormonkezelések hatására. Az eredmények azt mutatták, hogy a DJ-1 koncentrációja szignifikánsan csökkent a kezelt csoportban az első hét után, de szignifikánsan nőtt a harmadik hét végére. A CREB és a p38alpha koncentrációja szignifikánsan emelkedett a kezelt csoportban az első hét végére, azonban szignifikánsan csökkent a harmadik hét után. Ugyanakkor a JNK1 molekula koncentrációja kezdetben nem változott, de szignifikánsan csökkent a harmadik hetet követően.

11.5 A kezelések hatása a *D. magna* növekedésére és szaporodására

11.5.1 A 21 napos kezelési idő alatt nem tapasztaltunk szignifikáns különbségeket a kontroll és kezelt csoportok egyedeinek testmérete között. Az első peték megjelenéséhez szükséges napok száma a 10 ng L⁻¹ progesztogén keverékkel koncentrációnál szignifikánsan csökkent, azonban az első reprodukció során a peteszámok között nem figyeltünk meg szignifikáns különbségeket a kontroll csoporthoz képest. Az egy egyedre

jutó maximális petesejtek száma szignifikánsan nőtt az 1 ng L⁻¹-es és a 10 ng L⁻¹-es koncentrációknál a kontroll egyedekhez képest.

11.6 A GST génexpressziója és enzimaktivitásának változása

11.6.6 Megfigyeltük a progesztogén kezelések hatására megváltozó GST enzim expressziós szintjét. Vizsgálatainkban a GST relatív mRNS expresszióját a kezelési csoportokban a kontroll szinthez viszonyítottuk. Eredményeink azt mutatták, hogy a kontroll csoporthoz képest minden kezelési csoportban megnőtt a GST expressziós szintje. Megállapítottuk, hogy a GST enzim aktivitása is fokozódott 10, 100 és 500 ng L⁻¹-es kezelt csoportok esetében a kontroll csoporthoz képest.

12 RESULTS OF THE STUDIES

The aim of experimental research presented in this thesis was to observe the effects of long-term (6 and 21 days) progestogen exposure on invertebrate freshwater model species. In doing so, the concentrations of four progestogen compounds, progesterone, drospirenone, gestodene, levonorgestrel, found in different bodies of water were summarised. Guided by this data, specimens of the great pond snail (*Lymnaea stagnalis*) and the water flea (*Daphnia magna*) were exposed to environmentally relevant average (1 and 10 ng L⁻¹) and extremely high (100 and 500 ng L⁻¹) equi-concentrations of mixtures of progestogens in order to investigate the possible physiological effects in these well-established ecotoxicological model organisms.

The scientific results are as follows:

12.1 Effect of treatments on the development of snail embryos

The effect of chronic progestogen treatments on the embryonic development of *L. stagnalis* were found to result in quicker hatching time in all treated groups. All embryos in the 100 ng L⁻¹ group hatched by day 13 and most embryos in the 1, 10, and 500 ng L⁻¹ treated groups by day 14. In addition, we observed an accelerated development in the treated groups; pigmented eyes appeared at 84 h in the case of 100 ng L⁻¹ treated group.

12.2 Observed changes in embryonic behaviour

12.2.1 Alterations of the heart rate were observed in the progestogen-exposed embryos. No significant differences were found between the control and the 1 ng L⁻¹ treated groups. However, members of the 10, 100 and 500 ng L⁻¹ treated groups showed significantly higher heart rate. Furthermore, the cumulative number of gliding activities significantly increased in all the progestogen-treated groups. There were no significant changes in the embryonic feeding behaviour/ no changes in the radula motion/protrusion in the first three observation days between the control and the 10, 100 and 500 ng L⁻¹ exposed groups. Nevertheless, from the 13th embryonic day, a significant increase in the radula motion was observed in these groups.

12.3 Locomotion and feeding activities of adult snails

12.3.1 The chronic progestogen treatments significantly altered the locomotion and feeding activities of the adult specimens as well. Members of the 1 and 10 ng L⁻¹ groups covered a shorter average distance, indicating a significant decrease in the movement

activities. On the contrary, motions gradually increased in the 100 ng L⁻¹ group compared to the control one. Locomotion activities of the 500 ng L⁻¹ were not significantly impacted. Feeding behaviour of the groupings were influenced differently. Changes in the number of rasps in the 1 ng L⁻¹ group were irrelevant. However, in the 10 ng L⁻¹ group, the increase was significant. The 100 and 500 ng L⁻¹ groups showed a significant decrease in the rate of radule bites.

12.4 Determination of stress-activated protein kinases and cellular changes in the central nervous system

12.4.1 In order to reveal the possible underlying cellular mechanisms, we investigated the changes of four relevant key molecules in the CNS: DJ-1, cAMP responsive element-binding protein (CREB), p38alpha, and c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1). These molecules are identified in *L. stagnalis*. We have found that these molecules show significant quantitative changes during the progestogen exposure. The results showed that the concentration of DJ-1 decreased significantly in the treated group after the first week but increased significantly by the end of the third week. Concentrations of CREB and p38alpha increased significantly in the treated group by the end of the first week, but decreased significantly after the third week. However, the concentration of the JNK1 molecule did not initially change, but decreased significantly after the third week.

12.5 Effects on the growth and reproduction of *D. magna*

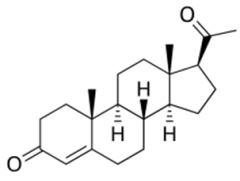
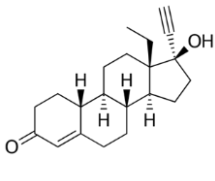
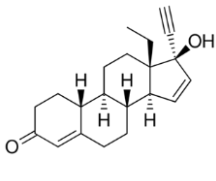
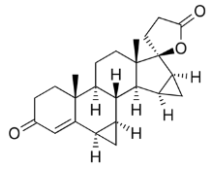
12.5.1 There was no significant difference in the body size between the control and the progestogen treated groups of *D. magna* during the 21-day observation. Production of the first eggs occurred significantly sooner in the 10 ngL⁻¹ treated group than in the control one. However, no significant alterations were observed in the number of eggs in the first production. In the 1 ng L⁻¹ and 10 ng L⁻¹ groups, the maximum egg number per individual gradually increased compared to the control group.

12.6 Alterations in GST gene expression and enzymatic activity

12.6.1 Changes in the GST gene expression were observed in the progestogen treated groups of *D. magna*. Compared to the control group, significant increases in the gene expression were found at all concentrations. We also found that GST enzyme activity was increased in the 10, 100, and 500 ng L⁻¹ treated groups compared to the control group.

13 FÜGGELÉK

F1. ábra: A progesztogén típusú fogamzásgátló hatóanyagok legfőbb jellemzői

	PRG	LNG	GES	DRO
Képlet				
Más nevek	(S)-progesterone; agolutin; akrolutin; corpus luteum hormone; crinone; delta(4)-pregnene-3,20-dione; gelbkoerperhormon; luteohormone; lutin; progesteronum; progestin	DL-norgestrel; 18-methylnorethisterone; alesse; levlen; levonelle; levonorgestrel; levonorgestrel implants; levonorgestrelum; levonova	Gestoden; Gestodene; GSD; Norgestrel; 15-Dehydronorgestrel; 17-hydroxy-18a-homo-19-nor-17α-pregna-4,15-dien-20-yn-3-one	1,2-dihydrospirorenone; DRSP; dehydrospirorenone; drospirenone; drospirenona; drospirenonum
CAS szám	57-83-0	797-63-7	60282-87-3	67392-87-4
Moláris tömeg	314,469 g/mol	312,453 g/mol	310,43 g/mol	366,501 g/mol
Formula	C ₂₁ H ₃₀ O ₂	C ₂₁ H ₂₈ O ₂	C ₂₁ H ₂₆ O ₂	C ₂₄ H ₃₀ O ₃
Atomszám	53	51	49	57
Gyűrűszám	4	4	4	7

Oldhatóság	oldható alkoholban, acetonban, dioxánban, tömény kénsavban; növényi olajokban gyengén oldódik; vízben 8,81 mg/L 25° C-on (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5994#section=Solubility)	oldható etanolban (1:120), kloroformban (1: 15), dietil-éterben (1: 400) és dioxánban; vízben 2,05 mg/L 25° C-on (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/13109#section=Solubility)	DMSO-ban > 20 mg/mL; vízben 8,11mg/L 25° C-on (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Geostodene#section=Solubility)	DMSO-ban ≥15mg/mL; vízben 1,81 mg/L 25° C-on (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/68873#section=Solubility)
-------------------	--	--	---	--

F2. ábra: Azonosított nukleotid és következtetett protein szekvenciák

>*Lymnaea stagnalis*_p38 alfa homológ_mRNS (#MW322711)

AAAATTATTCGGTATACCGGAAGTAATACACACAACCTTCGGGGAAAGACGACAATATTTTCAGGCTACAA
ATCGAGATATTCCTTGCCTCAAATTTAGTATCTGTTACTCTGCTGTGCAGGATATTTCTTGGATTGGCATT
TAGTGCATGGACTAATGGCGGATACTGCGCAACGCAAACCAGGGCTTGTGACAGTGAATTAATAAAAC
GATATGGGAGGTGCCCAGTCGATACAAAATCCAGAATCCTGTTGGAATTGGGGCATAACGGTCAAGTCGTA
TCTGCAACTGACAACCTATTATGCACCTCGAGTGGCCATTAAGAAACTTGCCCGCCCTTTTCAAACCTGCCA
TCCATGCCAAAAGAAGCTTACAGAGAACTACGTATGTTAAGGCATATGAACCATGAGAATGTGATTGATCT
AATTGATGTGTTTACACCAACAGTTACCCTGCAGGATTTTACAGATGTATACCTGGTGACTCCATTGATG
GGAGCTGATCTCAATAACATACTCAAACACAAAGGCTTAGCGATGACCATGTACAGTTTCTTGTGTTTACC
AAATTCTCAGAGGTTTAAAGTACATTCATTAGCTGGAATTTTACACAGGGACCTCAAGCCAAGTAATAT
TGCAGTGAATGAAGACTGTGAATTGAGGATTTTAGATTTTGGTCTAGCTCGTCTTACTGATGAAGAGATG
ACAGGTTATGTAGCCACAAGATGGTACAGGGCCCCAGAGATTATGCTTAACTGGATGCACTACAATCAGA
CAGTGGATATCTGGTCAGTTGGCTGTATTATGGCAGAAATGTTAACAGGACGACCCCTCTTTCCAGGCAG
TGACCACATCGACCAGCTGACAAGAATCTTAAATCTTGTAGGAACTCCAAACGATGAACTCATGGAGGAA
ATCAAAGCCAAGATGCAAACCTGTTTCAATCTCTACCTGTGATGACTCGTAAAGACTTCAAACAAG
TTTTTGCTGGATCCAACCCACTAGCCATTGATCTACTGGAGAAAATGCTGGATCTCAACACAAAGTCGAG
ACTCAATGCTACACAAGCCCTCGCACATGAGTATCTAAAACAGTATGCAGATCCTGCTGACGAACCAGTG
TCTGAGAAATATGACATGACTTTTGAAGATTATGACCTTAGTATCAATGAGTGGAAACAGCTTGTATTTG
AAGAAATAGAAAATTTCAAGCGGCCATCAACTCTCATAGCACGTCCATATCCTGAAGCTGTATGGAAG
TAGGTTTCGTTTACAGAGGACTATTTAAATCACAGCACTGAGCAAAGGGCAACTCTGTTTTTTTTTATTGTA
GAGAAATAACCCCTGAAGGTAAATTTAACTAAGAAGATCTTGTGTTGAAATGAAAATTTTAAAAATCATT
AGAATGGTATGAAAATAACCTCGCTGTTTATGGGTAATTTTTCACTTTTTTTATAATTAATCATAACAT
TCTGTATTTTTTAAATGAATTAAGGTAATAAGTTTTGTGGTCATGTGTGTCCACTATTCACCGCATTCA
TTATGACCTAGTGACGAATCCCTTCTTATGGTTTGAACATTTTTGTTCCAGTTTTGTTGATTGATTGCGAA

GCTTTGTAATCAACTGTTGCGAACATGTTAAATAATTGATGTCTTGTACTAACTTGGTTGGTTTTCTTGTT
GTTTTTTGTTTAAAAATATTACTATATTTTTGGGTTTTTTTTTACATGCGCAGTGCAGCATGTCTATTCAT
CTTGTAATAATGGACAGTAAACACATAAATGCATGATTGAATTGTGACGTGAATCATGAAAGAAAAGAAAA
TATTGACAAAACCGTATTTCAAATTTAACAATTTCAATTTTTAAAAAGCTTAATTACGCTCTTCATGTGA
ATTTTTAAAAAAAATTGTTATTAAAATTTAAAATGAAGGAAAGCTTAACAGACTTTCACATTACCTTTTA
TACTACTGCTTTAACTTTCTAGCAATGCCTCTATCAATGACTCATTCTTACGTGTGCTATGGTCAGAAAA
TGATGCATGAATTGCAGCTAGGGGCAACTACTTACGTTATGAGAATTATAGAATTATGTTTTCAAAAATAAG
TTCCCTCTGTCATGAGATTAATTTATTTAAAAGCTGAACCTTTGATGTATTTTTAAAATCCTTTATATTAAC
TTCGCTATTGTTTCATTGCTGGAAAAATCTTGAGACAGCTAATTGACCCACTTCTTGTCAACCTGTTGAG
CTGAACTTGGCACTCATTGCTGATGACAAGACATTCTGTCTAATTTTTCAACCCTAACCCCCAAAAATCA
AATTTTTCGGTTTTTCAAGGGGAAAATGAAGGAAATATGATGCTACTGACTTCAAGAAATAAAATCCCAG
ATAACTGCCTAAATGAGATTCTTTTTCAAGAATCTATGGCAAGTGCCTTTGGAGCGCATTATTTTTCTA
TTGTTTTTCTGAAATAATTGGTGAATAAATCTTTAGTGTAAGCAGGTGGGTTCATTTCGAATATCAATA
TGGTTCAGGGTCATTAAAAAAAAGTGCAGTTGCGAGCCGCGTGGGATGTGTGGGAGCACTATTTGGGTT
CTTTTAAAGTGCCTTACTCGCATGCATGTTTTGTGAAATTTTACAGCCCCACCCCCATTGTAGGATATTA
CATTTTCATAAAGCAGTTGTTTAAATGTCATCTTATTTAGAAATGATGTCATTCAGTTATGAAAACAGTTTG
TAAGAAGGCCATTATTATTTTAGAAAGGAGTTGTTTAAATGTCATCTTATTTGGAAATGATGTTATTTATT
TATTTAGGTATTTTTATATAGCGCTTACCTTAAAGCTCTAAGCGCTTTACAATTATAAAAACATGTAAAC
TAACTACAATAAAAATGAGACATTAGGATAGTAACTACTATTTCAGTTATGAAAACAGTTAGGAAGAAGGC
CGTTATTTATTTTAGAAAGGATTGCAACAATGCTCACACCCTTGGCAAATTTATTTCTGTGACTAAATACGT
CATTTTTTTTTATGTGTGCTCTTAGCTTATCTAAATTCATATTTTCAATTTAAGGGATACGCTTAAACCACATT
ACATATTGTTCCCTTGTGTCTGAATTTTGATTCAACTGTAACTTACCTTATGAATGTATGCTATTTGCTT
TATATTGCTAAATAATATTATCTTTTCTGGCCAAGCAGAGGGGACATCTATTTGAACTCAGTTCAGTACA
GCAATGTCATCACTGATACAGCTTTTTGCTGTTTAGTATTCCATTATCCTGAAGAGATGAGAAAAATTAG
TTCCAGGAAGGAATATTGATTGGTGTAAAACCTGCAGAAACGCTGAACAGAAGTTATTTTTAACAACAAAA
TACATATAAATTTGTGATCATGTTGTGACTTTGACTTTTGGAAAATGAAATGTAAAAAATGATTGAAGCC
AAACAGATGTAATGCCATTGGATGCTCAGAAGCATTCTATAGTTGGATACAATGCCATTGGATGCTCA
GAAGCATTCTATATTTGGATACAATTTAAAATTCCTTTATTTTATTATTAGCATTGAAGACTCATTTTT
TCAATATATTTGCATATTTTTGTACAAGTGATCTATTGTCTTTAACAAGCTTTGTGTTTACTATCACTTC
ACTCCCATGAAATATATTTAATTTATAATTTATAATTATCAACTGACATTGTTCTATGATCACCACCAC
TCACTTCCCCTTCATCTAATAACTGATCTATTTTTATTTTCAAACATTA

>*Lymnaea stagnalis*_p38 alfa

homológ_proteinMADTAQRKPLVTVELNKTIWEVPSRYKIQNPVIGIGAYGQVVSATDNLCTRVAI
KKLARPFQTAIHAKRTYRELRMLRHMNHENVIDLIDVFTPTVTLQDFTDVYLVTPLMGADLNNILKTQRL
SDDHVQFLVYQILRGLKYIHSAGILHRDLKPSNIAVNEDCELRIIDFGLARLTDEEMTGYVATRWYRAPE
IMLNWMHYNQTVDIWSVGCIMAEMLTGRPLFPDSDHIDQLTRILNLVGTPNDELMEEIKSQDAKLFIKSL
PVMTRKDFKQVFAGSNPLAIDLLEKMLDLNTKSRLNATQALAHEYKQYADPADEPVSEKYDMTFEDYDL
SINEWKQLVFEEIEKFQAAHQLS*

>*Lymnaea stagnalis*_JNK1 homológ_mRNS (#MW322712)

F3. ábra *A D. magna* növekedésének változása a 21 napos progesztogén kezelés során az R programnyelv megfelelő programcsomagjával elemezve és a Dunnet post-hoc tesztet alkalmazva. Pirossal a kontroll csoportot, olivazöld színnel az 1 ng L⁻¹-es, zöld színnel a 10 ng L⁻¹-es, kék színnel a 100 ng L⁻¹-es, míg ciklámen színnel az 500 ng L⁻¹-es csoportot jelöltük box plotok segítségével. Az 5. megfigyelési napon szignifikánsan nagyobbak a kezelt csoport egyedei a kontroll csoporthoz képest. [$F(4,20)=3,83$; $P < 0,01$]

