



SZENT ISTVÁN EGYETEM

**KÜLÖNBÖZŐ VEGYÜLETEK HATÁSÁNAK TÖBB GENERÁCIÓN
KERESZTÜLI VIZSGÁLATA A ZEBRADÁNIÓ (*DANIO RERIO*)
EGYEDFEJLŐDÉSÉRE**

Doktori értekezés tézisei

Kovács Róbert

Gödöllő

2017

A doktori iskola

Megnevezése: Állattenyésztés-tudományi Doktori Iskola

Tudományága: Állattenyésztési-tudomány

Vezetője: Dr. Mézes Miklós

egyetemi tanár, MTA rendes tagja
Szent István Egyetem, Mezőgazdaság- és
Környezettudományi Kar, Állattudományi Alapok
Intézet, Takarmányozástani Tanszék

Témavezető: Dr. Urbányi Béla

egyetemi tanár, DSc, MTA doktora
Szent István Egyetem, Mezőgazdaság- és
Környezettudományi Kar, Akvakultúra és
Környezetbiztonsági Intézet, Halgazdálkodási
Tanszék

Társtémavezető: Dr. Csenki-Bakos Zsolt Imre

tudományos munkatárs, PhD,
Szent István Egyetem, Mezőgazdaság- és
Környezettudományi Kar, Akvakultúra és
Környezetbiztonsági Intézet, Halgazdálkodási
Tanszék

.....
A doktori iskola vezetőjének jóváhagyása

.....
A témavezető jóváhagyása,

.....
A társtémavezető jóváhagyása

1 A munka előzményei, kitűzött célok

1.1 A munka előzményei

A különböző gyógyszerek fogyasztása ma már a mindennapjaink részévé vált. Ezek a vegyületek fontos szerepet játszanak az egészségünk megővésében és egy magasabb életminőség fenntartásában. Várhatóan a gyógyszerek fogyasztása a jövőben tovább fog növekedni, részben a humán populáció globális növekedése, részben az emberek hosszabb élettartama miatt. A fogyasztással párhuzamosan pedig folyamatosan növekszik a környezetbe kerülő gyógyszerhatóanyagok mennyisége is.

Mivel gyógyszerhatóanyagok sok helyen előfordulnak, és folyamatosan jelen vannak a környezetben, így pszeudó perzisztens szennyezőknek nevezhetjük őket. Jelenlétük a környezetben már régóta ismert és erős biológiai hatással rendelkező vegyületek révén felmerült a kérdés: vajon milyen hatással lehetnek a vizekben és a talajban élő szervezetekre és végső során ránk, emberekre? Korábban a gyógyszerhatóanyagok környezetbe jutásának legfőbb forrásai a gyógyszergyárak elfolyóvizei voltak, ma már látható, hogy az új „zöldebb” gyártási technológiák jelentősen csökkentették az innen származó szennyezés mértékét. Sajnos azonban az elfogyasztott és a testünkől kiürülő, valamint az el nem fogyasztott és kidobott gyógyszerek mind nagyobb mennyiségben kerülnek a kommunális szennyvizekbe, illetve a hulladéklerakókból a talajba.

A farmakonok népes csoportjai közül a természetes vizekbe jutott antineoplasztikus vegyületek környezeti kockázatának vizsgálata csak néhány évtizedre tekint vissza. Ez idő alatt elsősorban a különböző hatóanyagok jelenlétet mutatták ki kórházi és kommunális szennyvizekből, illetve nanogrammos tartományban néhány, szennyvizet befogadó természetes vízfolyásból. Több vegyület erősen citotoxikus, genotoxikus vagy hormon háztartást zavaró hatású, így potenciális veszélyt jelentenek az élőlényekre és ennek következményei akár populáció szinten is megnyilvánulhatnak. A környezeti kockázatbecslések alapján azonban ezek a gyógyszerek alacsony koncentrációjuk, illetve sok esetben a rövid felezési idejük miatt nem minősülnek kockázatosnak.

A környezeti kockázatbecslési modellek elsősorban akut és egy-két hónapos krónikus vizsgálatokból állnak, valamint kémiai analitikai stabilitás vizsgálatok eredményein alapszanak. Tényleges hosszútávú tesztek nem alkalmaznak, habár egy gerinces modellen végzett teljes életciklus, vagy több generációs vizsgálat sokkal árnyaltabb képet adhatna az antineoplasztikus hatású gyógyszerek tényleges környezeti kockázatáról.

A hosszú távú, akár többgenerációs ökotoxikológiai vizsgálatok fő gerinces modell szervezetei a halak. Mint gerinces szervezetek, alkalmazásuk egyik fő előnye, hogy egész életüket a vízben töltik, így folyamatosan ki vannak téve az itt megjelenő szennyező anyagoknak és azokat képesek egész testfelületükön felvenni. A hal modellszervezetek alkalmazásának másik fontos előnye, hogy a különböző laboratóriumi tesztekben használt fajok jól reprezentálják a szennyezőanyagok akvakultúrák rendszereiben tartott fajokra gyakorolt hatását is. Ennek a jelentősége különösen fontos, mivel a tógazdaságok sok esetben olyan vízbázisra épülnek, melyek befogadói a kommunális és az ipari szennyvizeknek. Az abban megjelenő gyógyszerhatóanyagok a termelés hatékonyságát is befolyásolhatják, vagy akár a feldolgozott állatok szöveteiben is megjelenhetnek. Habár ezek a xenobiotikumok mindig valamilyen keverék formájában jelennek meg a vizekben, nagyon fontos megismernünk, hogy az egyes vegyületek esetében külön-külön milyen hatásokkal kell számolnunk a környezeti koncentráció tartományokban.

A laboratóriumi halmodellek közül a zebra-dánió (*Danio rerio*) egyre elterjedtebben alanya nemcsak az akut, de a hosszútávú ökotoxikológiai vizsgálatoknak is. Mint lehetséges modell szervezetet, a halakra kidolgozott OECD és EPA toxicitás vizsgálatokban is javasolják. A fajt gyakran használják az OECD 210 szerinti halak korai életszakasz vizsgálatában, amely fontos része a humán és állatgyógyászati készítmények környezeti kockázatbecslésének. Az akut és szub-krónikus vizsgálatokra kidolgozott protokollokkal szemben jelenleg többgenerációs toxicitás vizsgálati OECD protokoll csak medaka (*Oryzias latipes*) halfaj esetében érhető el. Ez a protokoll kifejezetten az EDC vegyületek szaporodásbiológiai hatásainak vizsgálatára szolgál. Szükség volna azonban olyan átdolgozott módszerekre is, melyek más végpontokra, vagy szub-letális hatásokra fókuszálnának, mint pl. a genotoxicitás.

1.2 Célkitűzések

Vizsgálataim során négy különböző hatásmechanizmusú antineoplasztikus gyógyszerhatóanyag toxicitását vizsgáltam zebra-dánió modellen. Munkám célja az 5-fluorouracil (5-FU), a cisplatin (CisP), az etoposide (ET) és az imatinib mesylate (IM) esetében akut, szub-krónikus és krónikus kitétség mellett vizsgálni a vegyületek hatását az állatok embrionális és posztembrionális fejlődésre. Céлом volt meghatározni az akut tesztek során a vegyületek LC₅₀ értékeit felnőtt halakon és embriókon is. Vizsgálni kívántam ezen gyógyszerek keverékeinek akut letális hatását

zebradánió embriókon. Szub-krónikus kitettség során pedig az 5-FU és az IM esetében kívántam tanulmányozni a vegyületek hatását a zebradániók korai életszakaszában. Emellett pedig célom volt, kidolgozni egy tesztet, mely segítségével több generáción keresztül tanulmányozhattam az 5-fluorouracil és az imatinib toxicitását környezeti koncentrációhoz közeli tartományban is.

2 Anyag és módszer

2.1 Felhasznált állatok és tartási körülmények

Az állatkísérleteket a Szent István Egyetem Halgazdálkodási Tanszékén végeztem. A vizsgálatokhoz AB vad típusú zebradánió vonalat használtam. A halakat állandó vízfolyást biztosító recirkulációs rendszerben (Tecniplast Zebtec, Tecniplast, Buguggiate, Olaszország), 14 óra világos 10 óra sötét világítási programon tartottam a vizsgálatok megkezdése előtt. A recirkulációs rendszerben a víz hőmérséklete $25\pm 0,5$ °C-os, a pH $7,5\pm 0,2$, a vezetőképesség 525 ± 50 μ S volt. A halakat a naponta kétszer etettük SDS Small Gran (SDS – Special Diets Services Inc.) táppal, élő eleséggként hetente kétszer Artemia spp. (SERA GmbH.) naupliusz lárvát kaptak.

A vizsgálatokhoz felhasznált zebradánió embriók nyerésére a felnőtt egyedeket speciális, 1 literes szaporító edényekben ivattam (Tecniplast). A halakat az ivást megelőző nap délutánján helyeztem a szaporító medencékbe. A hím és a nőstény egyedeket a medencében egy átlátszó polikarbonát lemez választotta el. Az ivatás a következő reggel szinkronizáltan történt, a válaszfalak egy időben történő eltávolításával. Az ikrák összegyűjtését követően került sor az embriók válogatására, melyet sztereómikroszkóp alatt végeztem, ezt követően kerülhettek az ép és szabályosan fejlőd embriók a tesztmedencékbe.

Az elvégzett vizsgálatok a 1998, évi XXVIII. törvény alapján kiadott "Toxicológiai vizsgálatok halakon" című állatkísérlet végzésére (XIV-I-001/2303-4/2012) vonatkozó engedélyben foglaltak szerint zajlottak.

2.2 Akut felnőtt hal teszt

Az akut felnőtt halas vizsgálatokat az OECD 203-es vizsgálati protokoll alapján végeztem. A főtesztet megelőzően a dózistartomány meghatározásához un. határérték kereső (range finding) tesztet alkalmaztam. Ennek során a 1, 10 és 100 mg/l-es oldatot készítettünk minden vizsgált anyagból. Az előteszteket 1 literes polikarbonát medencékben végeztem el, minden medencébe 3 hal került. A fő tesztet csak azon anyagok esetében nem végeztem el, melyeknél a 100 mg/l-es koncentrációval kezelt halak közül egy sem pusztult el a vizsgálat ideje alatt. A 100 mg/l-es limit határértéket az OECD 203 protokoll alapján határoztam meg. A vizsgálatba vont halak mindegyike 6-8 hónapos korú volt. A halak átlagos testtömege $0,3\pm 0,1$ g, átlagos standard testhossza $2,5\pm 0,5$ cm volt. A főteszteket 3 literes polikarbonát medencékben végeztem, minden anyag esetében statikus kísérleti beállítást alkalmaztam, 5 koncentrációval. A vizsgálat alatt a

kezelőoldat hőmérséklete 24 ± 1 °C volt. Minden koncentráció esetében két ismétlést alkalmaztam, a medencékbe pedig 7-7 halat helyeztem. A vizsgálat időtartama az elő- és a főteszt esetében is 96 óra volt. A főtesztet a CisP-al és az IM-el végeztem el. A kontrol csoportokat rendszer vízben kezeltük a fentiekkel megegyező körülmények között két ismétlésben.

2.3 Akut embrió tesztek

Az akut embrió tesztek az OECD FET (Fish Embryo Toxicity Test) 2006 Draft guideline alapján terveztem. Ennek megfelelően az embriók legkésőbb 2 órával a termékenyülés után, a válogatást követően, még 8 sejtjes állapot előtt kerültek a tesztedényekbe. A tesztek időtartamát 120 órára növeltem, hogy minél több információt tudjunk gyűjteni az anyag hatásáról. A tesztek minden anyag esetében 24-es szövettenyésztő lemezekben végeztem, minden koncentráció esetében 20 embriót vizsgáltam, két ismétlésben. A kezelés statikus volt. 24 óránként vizsgáltam a mortalitást, illetve a szub-letális hatások megjelenését. Az 5-FU és az ET esetében oldószeres kontrol csoport is beállításra került.

2.4 Keverékek akut vizsgálata embriókon

Két vegyület esetében végeztem el a keverékek hatásának vizsgálatát. Ezek a CisP és az IM voltak. A keverékekben használt koncentrációk kiválasztásakor a két anyag akut embrió vizsgálatából származó 96 órás mortalitás adatait vettem figyelembe.

A vizsgálathoz mindkét vegyület 96 órás expozícióra vonatkozó LC_{50} , LC_{10} , LC_{20} , LC_{50} és LC_{90} számított értékeit használtam fel. A vegyületek azonos mortalitás értékeihez tartozó koncentrációk felének keveréke alkotta a kezelőoldatot (Cisplatin/Imatinib LC_{50} , LC_{10} , LC_{20} , LC_{50} , LC_{90}).

A keverékek vizsgálata az OECD 236 FET teszt (OECD, 2013) alapján zajlott. A OECD protokollban javasolt elrendezés helyett 3 ismétlésben végeztem a vizsgálatokat, ismétlésenként 10-10 embrióval. Az egyes ismétléseket külön 24-es szövettenyésztő lemezre helyeztem, így egy lemezre 2 koncentráció egy-egy ismétlése és 4 kontrol embrió került. A vizsgálatot 2 alkalommal végeztem el. A vizsgálat elvégzése során kapott eredmények alapján kiszámítottam az LC_{50} értékeket a 96 órás expozíció után.

2.5 Keverék prediktív toxicitásának kiszámítása

A rendelkezésre álló akut toxicitás eredmények alapján kiszámítottam a keverék prediktív toxicitásait is. Ennek során a koncentráció összeadódás

módszerét alkalmaztam, mely a két anyag hasonló hatását, tehát a keverékek összetevőinek ugyanolyan, vagy hasonló hatásmechanizmusát feltételezi a szervezetben. A keverékek becsült toxicitásának meghatározására egyrészt a koncentráció összeadódás (Concentration Addition-CA, Loew-féle addíció) módszerét használtam.

A prediktív toxicitás becslését elvégeztem a független hatás módszerének (Independent Action – IA, Bliss-féle független hatás) vizsgálatával is. Ennél a modellnek feltételezzük a két anyag esetében az egymástól független hatásmechanizmust és eltérő célterületet.

2.6 Szub-krónikus vizsgálatok fiatal zebradánió egyedeken

A korai életszakasz vizsgálatokhoz az OECD 210-es vizsgálati protokollját vettem alapul. Ezt a vizsgálatot az 5-FU és az IM esetében végeztem el, melynek elsődleges célja az volt, hogy megismerjük ennek a két anyagnak a szub-krónikus hatásait a halak korai fejlődésére. A tesztek során igyekeztem széles koncentráció tartományt vizsgálni, ezért az 5-FU esetében 10 és 100 ng/l, 1, 10, 100 µg/l, valamint 1 és 10 mg/l-es koncentrációkat alkalmaztam. Az IM esetében 100 ng/l, 1, 10 és 100 µg/l, valamint 1 és 10 mg/l voltak a tesztelt koncentrációk. Az 5-FU vizsgálata során oldószeres kontrol csoportot is beállítottam 0,01%-os koncentrációban (100 µl/L). Minden kezelt csoport esetében a DMSO mennyiségét 100 µl/L -re egészítettem ki. A tesztek időtartama 33 nap volt. Minden kezelési csoport esetében 2 ismétlést alkalmaztam, ismétlésenként 50-50 embrióval. A vizsgálat kezdetekor a FET teszthez hasonlóan az embriókat 8 sejtes állapot előtt helyeztem a kezelőoldatba, előzetes válogatás után. A kezelések mindkét esetben fél-statisztikus rendszerben folytak. A korai életszakasz vizsgálatok esetében az embriók és lárvák kezelését kezdetben 10 cm átmérőjű Petri-csészékben végeztem. Az embriókat naponta tiszta Petri-csészébe és előkészített friss oldatba helyeztem. 5 napos lárva stádiumban a lárvák nagyobb méretű (15 cm átmérőjű) Petri-csészékbe kerültek. A tesztoldatot naponta cseréltem ebben az esetben is. 15. nap után a lárvákat 11-es tesztedényekben kezeltem tovább a vizsgálat végéig. A tesztoldatot naponta részlegesen cseréltem (legalább 2/3 részben). Kétnaponta a halakat óvatosan tiszta edénybe helyeztem, friss tesztoldatba. Az elhullást naponta feljegyeztem a vizsgálat teljes ideje alatt. A vizsgálat végén a halkat 0,02 % Tricaine (Tricaine methanesulphonate; CAS. 886-86-2, Sigma-Aldrich) oldattal túlaltattam, majd lemértem a nedves testtömegüket és mikroszkóp segítségével fotókat készítettem a halakról a standard testhossz leméréséhez, melyhez ImageJ szoftvert használtam. A nedves és a 24 órás (60 °C) száraz

testtömeget is lemértem, melyhez analitikai mérleget használtam. A halakat a nagyon kis egyedsúlyok miatt, 5-ös csoportokban mértem le mind a nedves, mind a száraz testtömeg vizsgálatok esetében.

2.7 5-fluorouracil többgenerációs vizsgálata zezbradániön

A kísérlet során a halakat fél-statisztikus rendszerben és 3 koncentrációval kezeltem, melyek 10 ng 5-FU/l, 1 µg 5-FU/l és 100 µg 5-FU/l voltak. A koncentrációk kiválasztásakor figyelembe vettem a korábbi korai életszakasz teszt eredményeit, továbbá az irodalomban szereplő környezeti koncentrációkat. Minden kezelési koncentrációnál és az oldószeres kontrol csoport esetében is literenként 1 µl DMSO volt az oldatban. A vizsgálat alatt az oldószeres kontrol mellett negatív kontrol csoportot is alkalmaztam. Minden kezelési csoportnál két ismétlést alkalmaztam (A és B csoport). A vizsgálat során a halakat 25±1 °C-on tartottam.

A vizsgálat felépítésének és a teszt hosszának kialakításához elsősorban az EPA (2003) által publikált tanulmányt vettem alapul. A vizsgálat a kétgenerációs vizsgálati beállításokra támaszkodik, mely az F0 generációs már felnőtt, ivarérett egyedek szub-krónikus kéthetes előkezelésével kezdődik. Az F1 generációt teljes életciklusa alatt, míg az F2 generációt csak a korai életszakasz során volt kitéve a vizsgált anyag hatásának.

2.8 Imatinib multigenerációs vizsgálat

Az imatinib mesylate több generációs vizsgálata során, az 5-FU-hoz hasonlóan, három koncentrációt alkalmaztam, melyek a 10 ng/l, 1 µg/l és 100 µg/l voltak. Az 5-fluorouracil vizsgálatának tapasztalatai alapján több változtatást végeztem a vizsgálati tervben. Ennek elsődleges célja az volt, hogy az imatinib esetében még hangsúlyosabban vizsgáljam a szaporodási képességben bekövetkező változásokat.

2.9 Statisztikai értékelés

A FET tesztek esetében az LC₅₀ értékek meghatározásához Minitab 16 (Minitab, Coventry, Egyesült Királyság) programcsomagot használtam. A LC₅₀ értékek kiszámításához a protokollokban is ajánlott probit analízist alkalmaztam, 95%-os konfidencia intervallum mellett. A szub-letális hatások dózis-hatás összefüggésének értékelésekor nem lineáris regressziót alkalmaztam és az EC50 számításához a GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, USA) programcsomagot használtam.

A felnőtt halakon végzett vizsgálatok esetében szintén az OECD protokollt vettem alapul a kiértékeléskor. Ez alapján, hasonlóan a FET

teszthez, ezeknél a tesztekénél is Minitab 16 (Minitab, Coventry, Egyesült Királyság) programcsomag segítségével probit analízist alkalmaztam a LC_{50} értékek kiszámításához, 95%-os konfidencia intervallum mellett.

A vizsgált anyagok keverékeinek statisztikai elemzését az R program drc csomagjának segítségével végeztem el (R Development Core Team 2013). A nyers adatainkból mortalitást számoltam 96 órás expozíció mellett, majd logisztikus illesztést végeztem. A következtetéseket minden esetben 95%-os megbízhatósági szinten hoztuk meg ($p \leq 0,05$).

A korai életszakasz vizsgálat során a mortalitás LOEC és a NOEC értékek meghatározásához SPSS 14. szoftvercsomagot használtam. A két koncentráció határt független t próbával határoztam meg 95%-os konfidencia intervallum mellett. A test paraméterek vizsgálatokor GraphPad Prism 5.0 programot használtam. Az 5-FU esetében a testtömegek vizsgálatokor párosítatlan t próbát alkalmaztam, míg a testhossz eredmények értékelését egy szempontos varianciaanalízissel és Tukey's post hoc tesztet végeztem.

Az IM vizsgálat eredményeinek értékeléséhez GraphPad Prism 5.0 programot, egy szempontos varianciaanalízist és Dunnett's post hoc tesztet használtam szintén 95%-os megbízhatóság mellett.

A több generációs vizsgálat során kapott értékeket Microsoft Excel programmal dolgoztuk fel. A következtetéseket minden esetben 95%-os megbízhatósági szinten hoztuk meg ($p \leq 0,05$). A statisztikai elemzést a GraphPad Prism 5,0 statisztikai programcsomag segítségével végeztem el.

A mortalitás eredmények összehasonlítását GraphPad Prism 5,0 statisztikai programcsomaggal végeztem, valamint Fisher exact tesztet használtam, 95 %-os megbízhatóság mellett.

A normál eloszlást mutató adatok esetében egy szempontos varianciaanalízist és post hoc tesztként Tukey's tesztet, míg a nem normál eloszlást mutató adatok Kruskal-Wallis tesztet, míg a csoportok összehasonlításához Dunn's tesztet alkalmaztam.

A szaporodásbiológiai eredmények értékelése során a lerakott ikrák számát normalizáltam az ikrátételt adó nőivarú egyedek számával. Az IM F1 egyedek esetében meghatározott ivararány statisztikai értékeléséhez a százalékos eredményeket arcsin ($\arcsin(\sqrt{(x/100)})$) transzformációnak vettem alá.

3 Eredmények

3.1 Vizsgálatok felnőtt egyedeken

A felnőtt halakon végzett határérték kereső teszt során sem az 5-FU, sem az ET esetében nem tapasztaltunk elhullást a 100 mg/l-es kezelésnél.

A Cisp vizsgálatok a 96 órás teszt elvégzése után az LC₅₀ értéket 64,5 mg/l-ben határoztam meg felnőtt egyedekre. Az IM akut toxicitás is hasonló mértékű volt, ennél a vegyületnél az LC₅₀ értéket 96 órás expozíció után 70,8 mg/l-ben állapítottam meg.

3.2 A halembrió toxicitás teszt (FET) eredményei

Az 5-FU a zebradánió embriók fejlődése során 24 óránként határoztam meg az LC₅₀ értékeket az egyes vizsgált vegyületek esetében. Az 5-FU vizsgálatok, csak 72 órával a termékenyülés után volt módomban a mortalitás adatokból a legkorábbi fél-halálos koncentráció kiszámítására. 72 órával a termékenyülés után az LC₅₀ érték 2992 mg/l, 96 órával a termékenyülés után 2610 mg/l, míg 120 órával a termékenyülés után 2222 mg/l volt az LC₅₀ érték.

Az 5-FU embriókra gyakorolt hatásának vizsgálatok különböző deformitásokat tapasztaltam, melyek megjelenése dózis-hatás összefüggést mutatott. Ezen deformitások alapján számított fél-hatásos koncentráció (EC₅₀) 1723 mg/l volt 120 órás kitétség esetében. A legjellemzőbb megfigyelt torzulás a farok ventrális irányba történő görbülése (lordózis) volt, mely az 1000 mg/l-t meghaladó koncentrációkban volt látható. Ehhez hasonlóan csak az 1000 mg/l feletti koncentrációknál volt megfigyelhető az embriók szemében az érhártya tökéletlen záródása (*fissura choroidea*). Ilyen elváltozásokat sem a negatív, sem pedig az oldószeres kontrol csoportban nem találtam.

A Cisp, már az 5-FU-nál jóval alacsonyabb koncentráció tartományban is toxikusnak bizonyult. Bár a LC₅₀ érték 48 órás expozíció után meglehetősen magas volt (349,9 mg/l), a kezelés előrehaladtával ez az érték folyamatosan csökkent. 120 órás kitétség után az LC₅₀ érték a lárvák esetében 81,3 mg/l volt. A 100 mg/l-es kezelés és az ennél magasabb koncentrációknál 120 órás expozíció végére az összes egyed elpusztult.

A koncentráció növekedésével csökkent a kikelt lárvák aránya. Míg a kontrol csoport az inkubáció hatására 72 órára kikelt, addig a 100 mg/l-esnél kisebb koncentrációkban ez a kelés gátlás jól megfigyelhető volt és dózis-hatás összefüggést mutatott. A még ikrahéjban lévő állatokon semmilyen

morfológiai elváltozás nem volt megfigyelhető. A kelés gátlására számított EC_{50} érték 27,5 mg/l volt.

Az etoposide-dal kezelt embriók morfológiai vizsgálata során különböző deformitások voltak felfedezhetők. Ezek a farok hátsó szakaszának különböző irányba történő görbülése, szik és perikardiális ödémák voltak.

Az imatinib vizsgálata során az expozíciós idő növekedésével csökkent az LC_{50} érték. Míg az LC_{50} 158,3 mg/l volt 48 órás expozíció után, addig 72 óra után 141,6 mg/l, 96 óra után 118,0 mg/l és 120 óra után 65,9 mg/l volt. Az IM-el kezelt embriók esetében a leggyakrabban megnyilvánuló deformitás a farok ventrális irányba történő görbülése volt. E mellett azonban egyéb elváltozások is megfigyelhetőek voltak, mint például a 100 mg/l és annál nagyobb koncentrációk esetében a farok pigmentációjának csökkenése, különböző szik torzulások és pigmentációs zavarok megjelenése

3.3 Keverékek vizsgálatának eredményei

A keverékek tesztelésekor számított Cisplatin/Imatinib keverék LC_{50} értéke 53,1 mg/l volt a 96. órában, míg a CA módszerrel becsült LC_{50} érték Cisplatin/Imatinib keverékének esetében 94,33 mg/l volt. Az IA módszer alapján történő becslés sem jelezte előre pontosan a keverékek együttes hatását. A két antineoplasztikus vegyület együttes hatására az IA módszer becsült értéke az $LC_{50}/2$ keverékben 25,8% volt, míg a valós mortalitás érték elérte a 100%-ot.

3.4 Szub-krónikus vizsgálatok

Az 5-FU szub-krónikus tesztelése során minden csoportban meghaladta a kelés a 85%-ot 72 órával a termékenyülés után.

A vizsgálat teljes hosszának időtartamában szignifikáns eltérést a mortalitás tekintetében csak a legnagyobb, 10 mg/l-es kezelés (92%) esetében tapasztaltam (t-teszt, $p \leq 0,05$). A legkisebb mérhető toxikus hatás a pusztulás tekintetében (LOEC) így a 10 mg/l-es csoportnál volt megfigyelhető. Az oldószeres és a negatív kontrol csoportok között nem volt különbség a halak pusztulásának arányát tekintve.

A három mért testparaméter vizsgálata során a nedves és a száraz testtömeg, illetve a standard testhosszok összehasonlításakor is találtam igazolható különbségeket. A száraz testtömeg, valamint a testhossz paraméterek alapján az 1 mg/l-es kezelésnél ($0,695 \pm 0,024$ mg, $8,644 \pm 1,529$ mm) a halak átlagosan nagyobbak voltak mint a kontrol ($0,343 \pm 0,08$ mg, $6,783 \pm 1,4$ mm) csoport egyedei, azonban ez csak a testhossz esetében volt statisztikailag igazolható (Kruskal-Wallis teszt, Dunns post-hoc teszt

$p \leq 0,05$). Nedves testtömeg esetében csak a legnagyobb koncentrációnál volt látható ($7,06 \pm 0,12$ mg) növekedés a halak méretében ez azonban a kontrolhoz ($3,66 \pm 0,191$ mg) képest nem volt igazolható statisztikailag (Kruskal-Wallis teszt, Dunns post-hoc teszt $p \leq 0,05$, $p \leq 0,05$). Ez alapján a LOEC érték az 1 mg/l-es kezelés volt az 5-FU esetében.

Az imatinib-bel kezelt zebraadániók korai életszakaszában történő tesztelés során a halak mortalitása 36 és 47% között változott a kontrol és az 5 kisebb koncentráció között. Ezen csoportok között nem volt különbség a pusztulás tekintetében. A legnagyobb 10 mg/l-es kezelésnél a mortalitás azonban már meghaladta a 90%-ot, ami már szignifikánsan különbözött (t-teszt, $p \leq 0,05$) a kontrol csoporttól. Így a mortalitás tekintetében a 10 mg/l-es koncentráció tekinthető LOEC értéknek.

A vizsgált testparaméterek egyikénél sem volt igazolható eltérés a kezelt és a kontrol csoport között.

3.5 Többgenerációs vizsgálatok eredményei

Az 5-FU esetében az F1 generációban a korai életszakasz során (33 dpf) kiugró, 50%-ot meghaladó mortalitást a DMSO-val kezelt és az 1 $\mu\text{g/l}$ tapasztaltunk ez azonban nem volt statisztikailag igazolható a kontrol csoporthoz képest ($35,75 \pm 8,13$ %, Fisher exact test, $p \leq 0,05$).

Az F1 egyedek esetében a termékenyülés utáni 33. napon végzett vizsgálat során az 5-FU-val kezelt fiatal halaknak sem a nedves, sem a száraz testtömegében, sem pedig a testhosszban nem volt tapasztalható statisztikailag igazolható eltérés a kontrol csoporthoz képest.

Hasonlóan az F1 egyedeknél kapott eredményekhez, az F2 generáció fiatal halainál sem volt statisztikailag igazolható ($p \leq 0,05$) különbség a kontrol és a kezelt csoportok, illetve a DMSO-val kezelt (oldószeres kontrol) csoport nedves és száraz testtömeg, valamint a testhossz eredményei között.

Az F1 generáció vizsgálata a már felnőtt halak hét hónapos korában fejeződött be. A nedves testtömeg vizsgálatakor a kontrol ($0,195 \pm 0,032$ mg) és a DMSO-val ($0,194 \pm 0,039$ mg) kezelt csoport között nem volt kimutatható különbség. A 10 ng/l-es kezelés ($0,163 \pm 0,034$ mg) esetében a halak átlagos testtömege azonban igazolhatóan alacsonyabb volt a kontrol csoporténál (ANOVA, Tukey post hoc teszt, $p \leq 0,05$). A két magasabb koncentrációjú oldattal kezelt halaknál ezzel ellentétes hatást tapasztaltunk. Mind az 1 $\mu\text{g/l}$ -es ($0,235 \pm 0,038$ mg), mind pedig a 100 $\mu\text{g/l}$ -es kezelésnél ($0,225 \pm 0,044$ mg) a halak átlagos testtömege szignifikánsan nagyobb volt a kontrol csoporténál (ANOVA, Tukey post hoc teszt, $p \leq 0,05$).

A felnőtt egyedek átlagos testhosszának vizsgálatakor szintén nem találtuk különbséget a kontrol csoport ($23,2\pm 1,89$ mm) és a DMSO-val kezelt ($22,43\pm 1,6$ mm) csoport között. Egyedül az $1\ \mu\text{g/l}$ -es ($24,14\pm 1,73$ mm) kezelésnél volt megfigyelhető igazolható eltérés a DMSO-val kezelt csoporthoz képest (ANOVA, Tukey post hoc teszt, $p\leq 0,05$).

Az imatinib esetében sem volt pusztulás az F0 generációs kezelésében. Az F1 generáció korai szakaszában, a termékenyülését követő 33. napig tapasztalt mortalitás a kezelt csoportok esetében alig tért el a kontrol csoportban ($54,17\pm 4,95$ %) tapasztalt elhullástól.

Az imatinib-bel kezelt F2 generáció korai élet szakaszában azonban volt igazolható különbség a kezelt és a kontrol csoport ($51\pm 15,56$ %) elhullásában. Mind a $10\ \text{ng/l}$ -es ($86,67\pm 0,94$ %), mind a $1\ \mu\text{g/l}$ -es ($78\pm 10,37$ %), mind pedig a $100\ \mu\text{g/l}$ -es ($85\pm 8,96$ %) kezeléseknél az elhullás szignifikánsan magasabb volt (Fisher exact test, $p\leq 0,05$).

Az F1 generáció életének első 33 napjáig a nedves és a száraz testtömeg mérések esetében nem volt kimutatható különbség a kontrol és az IM-el kezelt csoportok között. A standard testhosszok összehasonlításakor azonban látható volt, hogy az 1 ($6,62\pm 0,93$ mm) és a $100\ \mu\text{g/l}$ -es ($6,53\pm 1,21$ mm) csoportokban a halak szignifikánsabb hosszabbak voltak a kontrol ($5,80\pm 1,30$ mm) csoport egyedeinél (Kruskal-Wallis teszt, $p\leq 0,05$).

Az F2 generáció esetében, a nedves és a száraz testtömegek és a testhosszak tekintetében nem volt tapasztalható eltérés a kezelt és a kontrol csoportok között.

Az IM kezelt F1 már felnőtt halak testtömegének összevetése során igazolható különbség volt felfedezhető a kontrol ($0,31\pm 0,084$ g), a $10\ \text{ng/l}$ -es ($0,245\pm 0,061$ g) és a $100\ \mu\text{g/l}$ -es ($0,255\pm 0,081$ g) kezelése között (ANOVA, Tukey teszt, $p\leq 0,05$). A testhossz esetében azonban a csökkent testméret csak a legkisebb koncentrációnál ($30,85\pm 1,98$ mm) volt statisztikailag igazolható. Bár az $1\ \mu\text{g/l}$ -es ($31,23\pm 2,37$ mm) és a $100\ \mu\text{g/l}$ -es ($31,15\pm 2,62$ mm) kezelése esetében is a halak testhossza kisebb volt, azonban ez nem bizonyult igazolhatóan különbözőnek a kontroltól ($32,23\pm 1,55$ mm, ANOVA, Tukey teszt, $p\leq 0,05$).

4 Új tudományos eredmények

1. Akut toxicitás tesztek segítségével elsőként határoztam meg a cisplatin és az imatinib mesylate fél-halálos koncentrációját zebradánió felnőtt egyedekre 96 órás expozíció mellett.
2. A vizsgálat vegyületekkel akut toxicitás vizsgálatokat végeztem zebradánió embriókon, mely során leírtam az 5-fluorouracil szub-letális hatásait (lordosis, fissura choroidea rendellenesség). A cisplatin esetében meghatároztam a pusztulás dózis-hatás összefüggéseit, illetve azonosítottam az embriókon a kezelés szub-letális (kelés gátlás) tüneteit. Az etoposide vizsgálatokor szub-letális hatásként a következő elváltozásokat írtam le: farok hátsó szakaszának görbülése, szik és perikardiális ödémák. Az imatinib mesylate esetében dózis-hatás összefüggést figyeltem meg az elhullás esetében, illetve leírtam a kezelés szub-letális hatásait (farok pigmentációjának csökkenése, különböző szik torzulások és pigmentációs zavarok).
3. Elsőként vizsgáltam a cisplatin és az imatinib keverékének toxikus hatását hal embriókon. Eredményeim alapján a IM és CA prediktív módszerekkel becsült letalitás értékek jóval alacsonyabb toxicitást feltételeztek, mint ami a valós keverékekben megfigyelhető volt, ez szinergisztikus hatásra utal.
4. Az imatinib esetében elsőként vizsgáltam a vegyület szub-krónikus toxicitását zebradániók korai életszakaszában.
5. Megállapítottam, hogy a zebradániók 5-fluorouracilnak való több generációs kitettsége, igazolhatóan befolyásolta az F1 generációban a felnőtt halak testhosszát.
6. Az imatinib több generációs vizsgálata során megállapítottam, hogy szignifikánsan magasabb volt az F2 generációban a halak mortalitása a 10 ng/l, 1 µg/l és a 100 µg/l koncentrációkban is a kontrolhoz képest. Emellett a 10 ng/l-es koncentrációban az F1 felnőtt halak testhossza és testtömege igazolhatóan kisebb, míg a 100 µg/l-es koncentrációban a halak testhossza ugyancsak igazolhatóan kisebb volt a kontrol halakéhoz viszonyítva.
7. Kidolgoztam egy több generációs vizsgálati módszert, mely nem csupán a szaporodásbiológiai hatások tanulmányozására alkalmas. A módszer lehetőséget nyújt az F1 és az F2 generációk esetében a fiatal halak fejlődésének nyomonkövetésére, illetve a nagyobb egyedszám miatt egyéb biológiai végpontok (pl. genotoxicitás) mérésére is.

5 Következtetések és javaslatok

5.1 Az akut vizsgálatok alapján levont következtetések

A felnőtt halakon végzett OECD 203 teszt alapján, az 5-FU toxicitása alacsonynak bizonyult (3. kategória - slightly toxic – alig toxikus), hiszen 100 mg/l-es koncentráció esetében a limit teszt során sem tapasztaltam elhullást a vizsgálati csoportokban. A zebradániótól eltérő környezeti igényű, szivárványos pisztráng (*Oncorhynchus mykiss*) esetében is hasonlóan alacsony toxicitást (NOEC 1000mg/l) tapasztaltak 48 órás expozíció után. Az 5-FU-hoz hasonlóan, nem tapasztaltam elhullást az etoposide esetében sem a limit teszt során. A vizsgált négy antineoplasztikus vegyület közül a cisplatin bizonyult a legtoxikusabbnak felnőtt zebradániókon.

Az általam végzett vizsgálatok alapján ezért megállapítható volt, hogy a CisP és az IM a számított LC₅₀ alapján mérésenként toxikusnak (2. kategória – moderatly toxic - mérsékelten toxikus tekinthető felnőtt halakra. A kapott eredmények alapján megállapítható, hogy a vizsgált négy vegyület toxicitása alacsony felnőtt halakon, így az ismert környezeti koncentráció tartományokban nem kell tartani akut mérgezés megjelenésétől. Az alacsony toxicitás oka vélhetően a molekulák gyenge felszívódása, illetve rövid felezési ideje. Emellett pedig a vízben található POC (Particular Organic Carbon) és DOC (Dissolved Organic Carbon) vegyületekhez kötődhetnek elsősorban az apoláros molekulák, így csökkentve tovább a felvehető szabad molekulák mennyiségét.

Az 5-FU-nál jóval toxikusabbnak bizonyult az embriókon a cisplatin, melynek ototoxikus hatása zebradánió embriókon jól ismert. Vizsgálatom során jól látható volt az LC₅₀ érték csökkenése az expozíció hosszának előrehaladtával. A mortalitáson kívül, dózis hatás összefüggést találtam a koncentrációk és a lárvák kelési arányának csökkenése között. Míg a 120 órás expozíció esetében az LC₅₀ érték 81,3 mg/l volt, addig a 27,5 mg/l-es koncentrációnál az életben lévő lárvák 50%-a nem kelt ki. A csökkent kelés hátterében a cisplatin fent már említett ototoxikus hatása állhat. Valószínűsíthető, hogy az általam végzett vizsgálatban tapasztalt kelés gátlás is a halak csökkent mozgás aktivitásából következett.

Az etoposide embrionális toxicitása bizonyult az 5-FU mellett a legalacsonyabbnak a vizsgált anyagok közül. Az etoposide vizsgálatokor megfigyelhető volt a 300 mg/l-nél nagyobb koncentrációk esetében a vegyület kikristályosodása az oldószer ellenére is, már a vizsgálat második napján. Vizsgálatomban az LC₅₀ érték 96 órás és 120 órás expozíció esetében is 300 mg/l felett volt. Az látható, hogy az etoposide akut

embrionális toxicitása is igen kismértékű, bár a vizsgált koncentrációkban megfigyelhető volt különböző embrionális elváltozások megjelenése.

A felnőtt halakon tapasztaltakkal szemben a FET teszt során az imatinib bizonyult toxikusabbnak a cisplatin-nal szemben. Ebben az esetben is látható volt az expozíciós idő növekedésével a csökkenő LC50 érték. Az egyes koncentrációknál különböző deformitások jelentek meg a fejlődő embriókon. Az imatinib magzati fejlődésre gyakorolt toxikus hatása jól ismert emlős modelleken. Az Gleevec® biztonsági dokumentációjában szereplő adatok alapján patkányok esetében 100 mg/ttm kg-os, vagy azt meghaladó mennyiségben (ez a 800 mg/nap humán maximális dózissal megegyező mennyiség) koponyacsontok hiányát és agyfejlődési rendellenességeket (anencephaly) okozott. Sajnos az imatinib esetében sem állnak rendelkezésre összehasonlító akut vizsgálati eredmények halakon.

5.2 A keverékeke vizsgálata alapján levont következtetések

A cisplatin és az imatinib keverékeinek vizsgálata során látható volt, hogy a keverékek toxicitása jóval nagyobb volt, mint azt az egyes anyagok külön-külön történő tesztelése alapján várható lett volna. A tesztelt keverékeknél tapasztalt magas mortalitást az alkalmazott prediktív modell egyike sem jelezte előre, melynek több oka is lehetett. Ezek a modellek elsősorban szubletális hatások becslésére lettek kidolgozva, melyet alacsony koncentráció tartomány mellett lehet vizsgálni. Esetemben azonban magas koncentráció tartományban vizsgáltam a mortalitást, mely egy durva végpontnak minősül.

Eredményeim és az irodalmi adatok alapján úgy tűnik, hogy mivel a vizsgált citosztatikumok független molekuláris útvonalakon fejtik ki hatásukat, a két vegyület hatása független egymástól. Ez azonban nem jelenti azt, hogy a hatások nem adódhatnak össze és ne erősíthetnék egymást, mint ami a zebradánió embriók mortalitás adatain is jól látható volt.

5.3 A szub-krónikus vizsgálatok alapján levont következtetések

Két vegyület esetében végeztem szub-krónikus vizsgálatokat. Az 5-FU-nál, szemben az alacsony akut toxicitásával, a vizsgálatot az indokolta, hogy jelenleg ez a vegyület a leggyakrabban alkalmazott antineoplasztikus hatású gyógyszer a fejlett országokban. A másik krónikus tesztben is vizsgált vegyület az imatinib volt, melynél a legmagasabb mortalitást tapasztaltam az akut embrió vizsgálatok során. Mindkét vegyület tesztelése során igyekeztem olyan tesztkoncentrációkat választani, melyekkel modellezni lehetett az irodalomban megjelenő mért és becsült környezeti koncentrációkat.

Az 5-FU szub-krónikus vizsgálata során a fejlődő embriókon nem tapasztaltam deformitásokat a vizsgált koncentrációkban. A kezelés végére a mortalitás szignifikáns növekedése egyedül a 10 mg/l-es koncentrációban volt megfigyelhető ($92\pm 2,8\%$). A halak testhosszában, az 1 mg/l-es koncentrációnál volt statisztikailag igazolható növekedés. Vizsgálatomban a 10 mg/l-es kezelésnél a nagymértékű elhullás miatt a medencében lecsökkent egyedsűrűség miatt nőhettek a halak nagyobbra, ezért ennek a kezelésnek a testparaméter eredményeit nem vettem figyelembe az értékelés során. Az 1 mg/l-es kezelésnél az elhullás azonban nem magyarázhatja a halak nagyobb testhosszát. A nedves és a száraz testtömeg esetében ez a növekedés nem volt igazolható. Eredményeim alapján úgy tűnik, hogy antimetabolikus hatású 5-FU 1 mg/l-es, hosszú távú kitétséggel a testnövekedésében is megfigyelhető módon avatkozott be az állatok fejlődésébe.

Az imatinib hosszú távú vizsgálata során csak a legnagyobb 10 mg/l-es kezelés esetében tapasztaltam a mortalitás szignifikáns mértékű növekedését. A halak testparamétereinek esetében nem volt látható eltérés a kontrol csoporthoz képest. A FET teszt során az IM bizonyult a legtoxikusabbnak, azonban még az 1 mg/l-es koncentráció tartományban 33 nap után sem volt látható hatása a kezelésnek.

5.4 A többgenerációs tesztek alapján levont következtések

A több generációs vizsgálathoz kialakított protokoll kezdő lépése az F0 generáció előkezelése volt, mely mindkét teszt során azonos módon zajlott és egyik kísérletnél sem tapasztaltam elhullást. Az F1 generációk életének korai szakaszában mindkét vizsgálatban a halak körülbelül fele élt túl függetlenül attól, hogy kezelt vagy kontrol csoportban neveltem őket. Ettől csak az 5-FU esetében a DMSO és az 1 µg/l-es csoportnál volt némi eltérés. Az F2 generáció ugyanezen életszakaszában mind a fluorouracil-lal, mind az imatinib-bel kezelt csoportoknál az F1-nél nagyobb mértékű mortalitást tapasztaltam. Ez az imatinib esetében statisztikailag is alátámasztható volt mindhárom koncentrációnál. A magasabb mortalitás legvalószínűbb magyarázata a kezelés hatására fellépő vitalitás csökkenés, lévén, hogy az 5-FU anitmetabolitként képes a sejtciklus S fázisába beavatkozni és ezzel zavarokat okozni a sejtek megújulásában. E mellett ismert a 5-FU genotoxikus hatása is hosszú távú kitétség esetén zebradánió modellen (amely szintén csökkentheti az állatok vitalitását. Meg kell azonban jegyezni, hogy az 5-FU vizsgálatkor a kontrol csoportoknál is nőtt a mortalitás mértéke az F2 generációban, míg a csak DMSO-val kezelt

csoportnál ez nem változott. Az IM kezelt egyedeknél tapasztalt pusztulásra több lehetséges magyarázat is adódik, mivel a tirozin kináz inhibitor hatását több útvonalon is kifejti, azonban ennek a hosszútávú következményeiről kevés adat áll rendelkezésre. Több vizsgálatban is leírták a krónikus mileoid leukémiában és 2, típusú diabéteszben egyaránt szenvedő betegek esetében, hogy az imatinib sikeresen kezelte mindkét betegséget. Tehát az imatinib befolyásolta mind az inzulin rezisztenciát, mind pedig a máj glükóz termelését. Ezek alapján elképzelhető, hogy az általam alkalmazott alacsony koncentráció mellett a kezelés megváltoztathatta a halakban a glükóz hasznosulását, ezzel pedig az befolyásolhatta az állatok anyagcsere folyamatait, így a vitalitásukat és növekedési erélyüket is.

A többgenerációs vizsgálatok esetében a halak korai életszakasza során megállapítható, hogy a halak túlélése az alkalmazott kezelési rendszerekben, a kontrol csoportokban sem haladta meg a 65%-ot. Vizsgálatomban, a mozgatással járó esetleges sérülések mellett a magasabb mortalitást az okozta, hogy a vizsgálatokba bevont halak száma az alkalmazott kísérleti beállítás (fél-statikus rendszer, kísérleti edények mérete) halnevelő képességének felső határát jelenti. Az alkalmazott módszerrel több hal felnevelése az adott rendszerben eredményesen nem lehetséges. A másodikként elvégzett, IM vizsgálatnál ezért is alkalmaztam 150-150 db embriót ismétlésenként az F1 generáció kezelésének kezdetén. A kiindulási egyedszámot egy ilyen, különösen hosszútávú vizsgálatnál nagyon nehéz meghatározni. Különösen, ha a halakat tovább is szeretnénk szaporítani. Ehhez minimum 100 embrió kezelésére van szükség az itt alkalmazott kísérleti beállítás mellett.

A vizsgálatok alapján megfigyeltem továbbá, hogy a fiatal halak életszakaszában a 14-16 dpf közötti időszak a legkritikusabb. Az általam alkalmazott nevelési hőmérsékleten, erre az időszakra tehető a szikholýag teljes felszívódása. Tehát az ezt követő periódusban a halak már csak az általuk felvett táplálékból nyerhetnek energiát. Tapasztalatom szerint, azok a halak, melyek erre az időszakra nem képesek az *Artemia* naupliusokat elfogyasztani, nagyon kis valószínűséggel maradnak később életben, függetlenül attól, hogy a kezelt vagy a kontrol csoportból származnak.

Vizsgálataim során a 33 dpf korú F1 halaknál, az 100 µg/l-es 5-FU-val kezelt csoportban az átlagos nedves testtömeg nagyobb, míg a száraz testtömeg kisebb volt a kontrol egyedekénél. Ezek alapján úgy tűnik, hogy ezen halak testének víztartalma magasabb volt. Ez az F2 generációnál már nem volt megfigyelhető. Ennél a generációnál a kezelt csoportok

mindegyikében az átlagos nedves és száraz testtömeg nagyobb volt, mint a kontrol csoport halaié.

Az IM-el kezelt egyedek esetében az F1 generációban az 1 és a 100 µg/l-es csoportoknál a halak nedves és száraz testtömege egyaránt csökkent. Azonban az átlagos testhossz ez esetben is szignifikánsan nagyobb volt. Ez a tendencia az F2 generációban már nem volt látható. A két legnagyobb koncentráció esetében a halak testhossza nagyobb volt ez azonban nem volt igazolható statisztikai módszerrel. Fontos kiemelni, hogy mindhárom csoport esetében jóval nagyobb mortalitás volt tapasztalható, mint a kontrol csoportban és ezért a kisebb egyedsűrűség miatt a halaknak nagyobbra kellett volna nőniük, hasonlóan, mint ahogyan az az 5-FU szub-krónikus vizsgálatában a 10 mg/l-es csoportnál látható is volt. Ezzel szemben, a 10 ng/l-es csoportnál a halak testtömege jóval alacsonyabb volt, mint a kontrol csoporté, míg a két nagyobb koncentráció esetében ez a paraméter szinte megegyezett a kontrol esetében megfigyelhető értékkel, vagy kissé meghaladta azt.

A felnőtt halak testparamétereinek meghatározása csaknem minden, az irodalomban megtalálható munkának fontos végpontja. Az 5-FU-val végzett vizsgálat során a felnőtt halak testtömegében minden kezelésnél szignifikáns különbség mutatkozott a kontrol csoporttól. Ám míg a két nagyobb koncentrációnál a halak átlagos tömege kisebb volt, addig a 10 ng/l-es kezelés esetében ez a paraméter növekedést mutatott. A standard testhosszok vizsgálatakor ilyen jelentős különbség nem volt látható. Ha ezeket az eredményeket összehasonlítjuk a korai életszakaszok eredményeivel, látható, hogy a két nagyobb koncentráció esetében minden vizsgálati végpontban a halak átlagos nedves tömege nagyobb volt a kontrol egyedekénél. Bár a 10 ng/l-es kezelésnél a fiatal egyedeknél is megfigyelhető volt ez a jelenség, azonban a felnőtt egyedek esetében a 7 hónapos kitétség pont az ellenkező hatást eredményezte. A magyarázat az 5-FU esetében a koncentráció tartományok (100, illetve 10000 szoros) közti különbségekben lehet. A kapott eredmények alapján elképzelhetőnek tartom, hogy a nanogrammos koncentráció tartományban a kisebb mennyiségű, felvett 5-FU hatására más molekuláris és élettani folyamatok, illetve más intenzitással zajlottak le, mint a mikrogrammos tartományban.

Az IM esetében a felnőtt halak testtömege a kezelés hatására egyértelműen csökkent kisebb, vagy nagyobb mértékben. Ez a csökkent testméret ennél a vegyületnél igazolhatóan csak a 10 ng/l-es kezelésnél volt látható a testhossz tekintetében. A korai életszakaszokban mért eredményekkel ezt összevetve láthatunk némi különbséget. A rövidebb

expozíciók esetében inkább a testhossz növekedése volt a jellemző a kezelt csoportokra, mintsem a csökkenés. Az F1 generációnál a nagyobb koncentrációkban a halak tömege pedig inkább csökkent. Az F2 generációban a testtömegek tekintetében azonban a legkisebb koncentrációban a halak tömege egyértelműen kisebb volt. Véleményem szerint, ha más biológiai útvonalak érintettségével is, de itt is az 5-FU-hoz hasonló a koncentráció különbségből adódó folyamatok játszódhatnak a háttérben.

Az eredmények alapján úgy gondolom, hogy a hosszú távú kezelés hatására mind az 5-fluorouracil, mind pedig az imatinib mesylate változásokat okozott a halak anyagcsere folyamataiban. Az 5-FU esetében ennek egy korábbi munkánkban a toxikogenomikai vizsgálatban próbáltunk magyarázatot találni. Látható volt, hogy elsősorban az apoptotikus folyamatokkal és a DNS javító mechanizmusaival összefüggő gének szabályozódtak felül (bcl2, xrcc5, stb.), míg a fehérje szintézissel kapcsolatos több gén alulszabályozott volt (cth, stb.). Bár voltak folyamatok, melyek a nanogrammos koncentráció tartományban felül-regulálódtak (pl. szignál transzdukciós folyamatok, immunfolyamatok) és a mikrogrammos tartományban nem szabályozódtak túl. Az ellenkezőjére is volt példa, ahol a kisebb tartományban a gének alulműködtek (pl. transzmembrán folyamatok, riboszóma biogenezis), míg a nagyobb koncentráció tartományban nem volt kimutatható hatás. Olyan azonban nem volt megfigyelhető, hogy egyes folyamatok az egyik koncentráció tartományban felül szabályozódtak és a másokban alulszabályozódtak volna. Az IM esetében, bár ilyen eredmények még nem állnak a rendelkezésemre, azonban tirozin kináz inhibitoroként, több élettani szempontból fontos útvonalat befolyásol.

5.5 Javaslato

- A dolgozatban bemutatott akut embrió toxicitás tesztekét még a FET teszt egy tervezete alapján végeztem. A 2013-ban bevezetett, már végleges FET protokoll is 96 órás korig javasolja a halak kezelését. Véleményem szerint a teszt időtartamának 120 órára történő megnyújtása számos előnnyel járna. Mivel a zebradánió lárvák inkubációs hőmérséklettől függően 72 és 90 óra között kelnek, ezért a 96 órás expozíció esetében előfordulhat, hogy a kelés elnyúlása miatt nem minden egyed fog kikelni akár a kontrol csoportban sem. Ezt a problémát a 24 órával növelt kezelési idő egyértelműen kiküszöbölné és pontosabb adatokat kaphatnánk a

vizsgált molekula kelésre gyakorolt hatásáról. A teszt meghosszabbításának további előnye lenne, hogy a 120 órás, már elúszó halakon végezhető lenne mozgás aktivitás vizsgálat (locomotor response), mely kvantitatív mérésére alkalmas rendszerek egyre több laborban megtalálhatóak.

- A zebradánió halfajon végzett reprodukciós képességet is vizsgáló toxikológiai tesztek során legalább 5 szaporítást kell végezni, mellyel már csökkenthető a lerakott ikra mennyiség ciklikusságának torzító hatása az eredményekben.
- A keverékek tesztelésekor nyilvánvalóvá vált, hogy a mortalitás, mint végpont nem tökéletes a keverékek hatásának tanulmányozásához. Erre zebradánió embriók esetében is olyan szub-letális végpontot kell választani, mely jól reprezentálja az adott anyagok hatását. Ilyen szub-letális hatás vizsgálathoz viszont szükséges a FET teszt módosítása, hogy több ismétlésben vizsgálható legyen a megjelenő elváltozások aránya. A FET teszt esetében megoldás lehet a teszt végén a halak testhosszának mérése, mellyel az életben maradt egyedeknél jól számszerűsíthető paraméter alapján lehetne a csoportokat összehasonlítani.
- A többgenerációs vizsgálatok alapján látható volt, hogy mindkét vegyület esetében számolni kell a nanogrammos koncentráció tartományban is a hosszú távú hatásokkal a vízi szervezetek esetében. Ezért mindenképpen javasolnám a citotoxikus vegyületek esetében a becsült környezeti koncentráció (PEC) közelében hal modellen legalább teljes életciklus tesztet végezni. Az Európai Gyógyszer Ügynökség (EMA-Europen Medicines Agency) jelenlegi szabályozása szerint csak a 10 ng/l vagy annál magasabb PEC érték esetében szükséges Phase II., Tiar A vizsgálatokat végezni, melybe beletartozik a halak korai életszakasz vizsgálata is. Az ilyen tesztek alapján azonban, mint az szub-krónikus vizsgálataimból is látható volt, nem lehet mindig elegendő információt szerezni ilyen erős biológiai hatású vegyületek hosszú távú hatásairól.

Az értekezés témakörében megjelent közlemények

Tudományos közlemények folyóiratban:

- R. Kovács**, K. Bakos, B. Urbányi, J. Kövesi, Gy. Gazsi, A. Csepeli, A. János Appl, D. Bencsik, Zs. Csenki, Á. Horváth (2015): Acute and sub-chronic toxicity of four cytostatic drugs in zebrafish. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(15): 14718–14729. (IF 2,828)
- R. Kovács**, Zs. Csenki, K. Bakos, B. Urbányi, Á. Horváth, V. Garaj-Vrhovac, G. Gajski, M. Gerić, N. Negreira, M. L. de Alda, D. Barceló, E. Heath, T. Kosjek, B. Žegura, M. Novak, I. Zajc, Š. Baebler, A. Rotter, Ž. Ramšak, M. Filipič (2015): Toxicity of low doses of 5-fluorouracil in zebrafish (*Danio rerio*) after chronic exposure to low doses of 5-fluorouracil in a two-generation study. *Water Research*, 77: 201-212. (IF: 5,528)
- Kovács R.**, Urbányi B., Kovács B., Bencsik D., Staszny Á., Hegyi Á., Csenki Zs. (2009): A zebradánió (*Danio rerio*) mint a toxikológiai vizsgálatok modellállata. *AWETH*, 5(4): 446-447.

Konferencia kiadványban összefoglalóként megjelent közlemények:

- Kovács R.**, Bakos K., Reining M., Appl Á., Ferincz Á., Horváth Á., Csenki Zs., Filipic M., Urbányi B. (2015): Különböző anti-neoplasztikus gyógyszermolekulák rövid és hosszú távú hatásának vizsgálata zebradánió (*Danio rerio*) modellen. TOX'2015 Konferencia, 2015 október 14-16., Harkány
- Kovács R.**, Bakos K., Reining M., Appl Á., Gazsi Gy., Garaj-Vrhovac V., Ferincz Á., Horváth Á., Csenki Zs., Filipic M., Urbányi B. (2015): Különböző anti-neoplasztikus gyógyszer molekulák rövid és hosszú távú hatásának vizsgálata zebradánió (*Danio rerio*) modellen. V. Ökotoxikológiai Konferencia, 2015. november 20., Budapest
- Kovács R.**, Csenki Zs., Tarcai Zs., Bencsik D., Gazsi Gy., Bakos K., Kovács B., Gajski G., Gerić M., Garaj-Vrhovac V., Urbányi B., Horváth Á., Filipic M. (2013): Az 5-fluorouracil krónikus toxicitásának vizsgálata hal modellen, két generáción keresztül. XXVII. Halászati Tudományos Tanácskozás, 2013. május 22-23., Szarvas
- Kovács R.**, Tarcai Zs., Gazsi Gy., Bencsik D., Bakos K., Kovács B., Urbányi B., Filipič M., Csenki Zs., Horváth Á. (2012): Citosztatikumok

hatásának vizsgálata zebra dánió (*Danio rerio*) modellen. XXXVI. Halászati Tudományos Tanácskozás, 2012. május 23-24., Szarvas

Kovács R., Csenki Zs., Bakos K., Kovács B., Urbányi B., Horváth Á. (2012): Acute toxicity of cytostatic drugs on zebrafish (*Danio rerio*). 1st CytoThreat workshop on the effects of residues of cytostatics and other pharmaceuticals on non-target organism, 2012. október 16-18., Nápoly, Olaszország

Kovács R., Csenki Zs., Tarcai Zs., Gazsi Gy., Bencsik D., Bakos K., Kovács B., Urbányi B., Filipič M., Horváth Á. (2012): Effects of 5-fluorouracil and cisplatin to the embryonic and early life stage development of zebrafish (*Danio rerio*). Fish and amphibian embryos as alternative models in toxicology and teratology, 2012. október 23-24., Aulnay-sous-Bois/Párizs, Franciország

Az értekezés témaköréhez nem kapcsolódó, fontosabb közlemények

Tudományos közlemények folyóiratban:

Balázs, A., Krifaton, Cs., Orosz, I., Szoboszlai, S., **Kovács, R.**, Csenki, Zs., B. Urbanyi, Kriszt, B. (2016): Hormonal activity, cytotoxicity and developmental toxicity of UV filters. *Ecotoxicology and environmental safety*, 131: 45-53. (IF:F 3,130)

Szabó E.R., Plangár I., Tőkés T., Mán I., Polanek R., **Kovács R.**, Fekete G., Szabó Z., Csenki Zs., Baska F., Hideghéty K. (2016): l-Alpha Glycerylphosphorylcholine as a Potential Radioprotective Agent in Zebrafish Embryo Model. *Zebrafish*, 13(6): 481-488. (IF 2,175)

Gazsi Gy., Baska F., Baska B., Csenki Zs., Kövesi J., Appl Á. J., Bakos K., Csepeli A., Reining M., **Kovács R.** (2014): A labormodell zebra dánió (*Danio rerio*) legfontosabb betegségei: Irodalmi áttekintés és saját eredmények. *Magyar Állatorvosok Lapja*, 136:677–687. (IF:0,185)

Csorbai B., Pereszlényi Á., **Kovács R.**, Urbányi B., Horváth L. (2014): The habitat use and selectivity by topmouth gudgeon (*Pseudorasbora parva*). *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 60(4): 389-400. (IF:0,5)

Staszny Á., Havas E., **Kovács R.**, Urbányi B., Paulovits G., Bencsik D., Ferincz Á., Müller T., Specziár A., Bakos K., Csenki Zs. (2013): Impact of environmental and genetic factors on the scale shape of zebrafish

- Danio rerio* (Hamilton 1822): a geometric morphometric study. *Acta Biologica Hungarica*, 64(4): 462–475. (IF:0,504)
- Bakos K., **Kovács R.**, Staszny Á., Kánainé Sipos D., Urbányi B., Müller F., Csenki Zs., Kovács B. (2013): Developmental toxicity and estrogenic potency of zearalenone in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*, 136–137: 13-21. (IF: 3,513)
- Rác G., Csenki Zs., **Kovács R.**, Hegyi A., Baska F., Sujbert L., Zsákovics I., Kis R., Gustafson R., Urbányi B., Szende B. (2012): Subacute toxicity assessment of water disinfection byproducts on zebrafish. *Pathology & Oncology Research*, 18: 579-584. (IF:1,555)
- Csenki Zs., Zaucker A., Kovács B., Hadzhiev Y., Hegyi Á., Lefler K.K., Müller T., **Kovács R.**, Urbányi B., Váradi L., Müller F. (2010): Intraovarian transplantation of stage I-II follicles results in viable zebrafish embryos. *The International Journal of Development Biology*, 54: 585-589. (IF:2,856)