

SZENT ISTVÁN EGYETEM

**HAGYOMÁNYOS VÍZTISZTÍTÁSI TECHNOLÓGIÁK SORÁN VISSZAMARADÓ  
MELLÉKTERMÉK VEGYÜLETEK VIZSGÁLATA HALMODELLEN**

Doktori (PhD) értekezés

Bencsik Dóra

GÖDÖLLŐ

2019

**A doktori iskola**

**megnevezése:** Állattenyésztés-tudományi Doktori Iskola

**tudományága:** Állattenyésztési tudományok

**vezetője:** Dr. Mézes Miklós  
egyetemi tanár, az MTA rendes tagja  
Szent István Egyetem Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar  
Állattudományi Alapok Intézet, Takarmányozástani Tanszék

**Témavezető:** Dr. Csenki-Bakos Zsolt Imre  
tudományos munkatárs, PhD  
Szent István Egyetem Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar  
Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet, Halgazdálkodási Tanszék

**Társtémavezető:** Dr. Urbányi Béla  
egyetemi tanár, az MTA doktora  
Szent István Egyetem Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar  
Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet, Halgazdálkodási Tanszék

.....  
Az iskolavezető jóváhagyása

.....  
A témavezető jóváhagyása

.....  
A társtémavezető jóváhagyása

## Tartalom

1.	Jelölések, rövidítések jegyzéke .....	1
2.	Bevezetés és célkitűzés .....	5
3.	Irodalmi áttekintés .....	8
3.1.	Az ivóvíz jelentősége, az ivóvízzel kapcsolatos globális egészségügyi problémák .....	8
3.2.	Az ivóvíz kezelése, fertőtlenítése .....	11
3.2.1.	Nyersvíz források az ivóvíz ellátásban.....	11
3.2.2.	Az ivóvíz kezelése.....	12
3.3.	A fertőtlenítés során keletkező melléktermékek csoportosítása és toxikológiai megítélése .....	14
3.3.1.	Szabályozás hatálya alá eső víztisztítási melléktermék vegyületek.....	15
3.3.2.	A szabályozás alá nem eső víztisztítási melléktermék vegyületek .....	18
3.3.3.	Szennyezőkből kialakult melléktermék vegyületek.....	23
3.4.	A víztisztítási melléktermék vegyületek humán egészségügyi vonatkozásai.....	26
3.4.1.	A 4-etilbenzaldehid jellemzése, toxikológiai vonatkozásai .....	28
3.5.	A 4-EBA, mint élelmiszeripari adalékanyag .....	29
3.5.1.	A benzaldehyd, mint aromaanyag toxikológiai vonatkozásai.....	29
3.5.2.	A 4-etilbenzaldehyd élelmiszertoxikológiai vonatkozásai.....	30
3.6.	A 2-4-difluoroanilin jellemzése, toxikológiai vonatkozásai.....	31
3.7.	Halmodellek a toxikológiában .....	32
3.7.1.	A zebradánió, mint toxikológiai vizsgálatok modellállata.....	33
3.8.	Genotoxikológiai vizsgálatok, különös tekintettel a halakon alkalmazható módszerekre .....	35
3.8.1.	A comet assay.....	36
3.8.2.	A mikronukleusz assay.....	40
3.8.3.	A microarray assay .....	42
4.	Anyag és módszer .....	46
4.1.	A kísérletek helyszíne, az állatok tartása .....	46
4.2.	A vizsgálati anyagok és előkészítésük.....	46
4.3.	Vizsgálatok .....	47
4.3.1.	Előkísérletek.....	47
4.3.2.	120 órás embrió tesztek.....	47
4.3.3.	LC-értékek meghatározása a 96-120 órás expozíciós ablakban.....	48
4.3.4.	Microarray vizsgálat és transzkriptom analízis .....	48
4.3.5.	1 dpf embriókon végzett comet assay vizsgálat .....	49
4.3.6.	Kifejlett halakon végzett mikronukleusz teszt .....	51

4.3.7.	Regenerációs kapacitás vizsgálata lárvánokon .....	52
5.	Eredmények .....	53
5.1.	Előkísérletek .....	53
5.2.	Akut embrió vizsgálatok.....	53
5.2.1.	2,4-difluoroanilin .....	53
5.2.2.	4-etilbenzaldehyd .....	56
5.2.3.	LC-értékek meghatározása a 96-120 órás expozíciós ablakban .....	57
5.3.	Microarray vizsgálat és transzkriptom analízis .....	59
5.4.	1 dpf embriókon végzett comet assay vizsgálat .....	62
5.5.	Kifejlett halakon végzett mikronukleusz assay .....	62
5.6.	Regenerációs kapacitás vizsgálata.....	64
6.	Új tudományos eredmények .....	66
7.	Következtetések.....	67
7.1.	Akut halembrió toxicitás tesztek eredményeiből levonható következtetések .....	67
7.2.	A transzkriptom analízis és annak eredményét igazoló vizsgálatokból levonható következtetések.....	70
7.3.	Javaslatok .....	76
8.	Összefoglalás .....	77
9.	Summary.....	79
10.	Mellékletek.....	81
	M1 Irodalomjegyzék .....	81
	M2 Ábrák és táblázatok jegyzéke .....	102
11.	Köszönetnyilvánítás .....	104

## 1. Jelölések, rövidítések jegyzéke

<b>3R</b>	Az állatkísérletek kiváltására, a kísérleti állatok számának csökkentésére és az állati szenvedés minimalizálására kialakított stratégia ( <i>Replacement, Reducement, Refinement</i> )
<b>4-EBA</b>	4-etilbenzaldehyd
<b>ADI</b>	elfogadható napi bevitel ( <i>acceptable daily intake</i> )
<b>ALS</b>	alkáli-labilis helyek ( <i>alkali-labile sites</i> )
<b>aPKC</b>	atipikus protein-kináz C gén
<b>BMX</b>	a 3-kloro-4-(diklorometil)-5-hidroxi-2(5H)-furanon brominált analógjai
<b>BS</b>	elmosódott testszegmensek
<b>CAS szám</b>	„ <i>Chemical Abstracts Service</i> ” regisztrációs szám
<b>CAID</b>	krónikus pitvari és intesztinális diszritmia ( <i>chronic atrial and intestinal dysrhythmia</i> )
<b><i>ccnb1</i></b>	cyclin B1 gén
<b><i>ccnb2</i></b>	cyclin B2 gén
<b><i>cdc20</i></b>	cell division cycle 20 homolog gén
<b><i>cdca8</i></b>	cell division cycle associated 8 gén
<b><i>cdca7a</i></b>	cell division cycle associated 7a gén
<b>cDNS</b>	komplementer dezoxiribonukleinsav
<b>CHO</b>	kínai hörcsög ovárium ( <i>chinese hamster ovary</i> ) sejtvonal
<b><i>cks1b</i></b>	CDC28 protein kinase regulatory subunit 1B gén
<b>CLSA/GC-MS</b>	zártrendszerű illatanyag gyűjtés/gázkromatográfiás elválasztással kombinált tömegspektrometria
<b>COX</b>	ciklooxygenáz enzim(ek)
<b>DBP</b>	vízisztítási/vízfertőtlenítési melléktermék vegyület(ek) ( <i>disinfection by-product(s)</i> )
<b>DFA</b>	2,4-difluoroanilin
<b>DNS</b>	dezoxiribonukleinsav
<b>dpf</b>	a termékenyülés után eltelt napok száma ( <i>days post fertilization</i> )
<b>DOM</b>	oldott szervesanyag ( <i>dissolved organic matter</i> )
<b>ECHA</b>	Európai Vegyianyag Ügynökség ( <i>European Chemicals Agency</i> )
<b>EDC</b>	endokrin rendszert zavaró anyag(ok) ( <i>endocrine disrupting compounds</i> )

<b>EFSA</b>	Európai Élelmiszerbiztonsági Hatóság ( <i>European Food Safety Authority</i> )
<b>EMS</b>	etil-metánszulfonát
<b>EMX</b>	a 3-kloro-4-(diklorometil)-5-hidroxi-2(5H)-furanon geometriai izomere
<b><i>ercc61</i></b>	excision repair cross-complementation group 6-like gén
<b><i>esco2</i></b>	establishment of sister chromatid cohesion N-acetyltransferase 2 gén
<b>EU</b>	Európai Unió
<b>FAO</b>	az Egyesült Nemzetek Élelmezésügyi és Mezőgazdasági Szervezete ( <i>Food and Agricultural Organization of the United Nations</i> )
<b><i>fbx05</i></b>	F-box protein 5 gén
<b>FDA</b>	az Egyesült Államok Élelmiszer -és Gyógyszerengedélyeztetési Hivatala ( <i>United States Food and Drug Administration</i> )
<b>FISH</b>	fluoreszcens <i>in situ</i> hibridizáció
<b>GPx</b>	glutathion peroxidáz enzimek
<b>GST</b>	glutathion-S-transzferáz
<b>HAA</b>	haloecetsavak
<b><i>has</i></b>	aPKC mutációt hordozó <i>heart and soul</i> mutáns zebradánió vonal
<b>HeLa</b>	humán méhnyak eredetű epiteliális adenokarcinóma sejtvonal (Henrietta Lacks-tól származó)
<b>HM</b>	fejtorzulás
<b>HL-60</b>	humán promieloid leukémia sejtvonal
<b>hpf</b>	az ikra termékenyülésétől eltelt órák száma ( <i>hours post fertilization</i> )
<b>HSC-2</b>	humán laphám karcinóma sejtvonal
<b>HSC-3</b>	humán laphám karcinóma sejtvonal nagy metasztázis-képző potenciállal
<b>HSC-4</b>	nyelvből származó humán laphám karcinóma sejtvonal
<b>IARC</b>	Nemzetközi Rákkutató Ügynökség ( <i>International Agency for Research on Cancer</i> )
<b><i>kif23</i></b>	kinesin family member 23 gén
<b>KG-1</b>	humán akut mielogén leukémia sejtvonal
<b>LC<sub>50</sub>/LD<sub>50</sub></b>	félhalálos koncentráció, az a kezelési koncentráció, melynek hatására a kezelt egyedek 50%-a elpusztul
<b>LC<sub>x</sub>/LD<sub>x</sub></b>	Az egyedek X%-ának pusztulását okozó koncentráció/dózis.
<b><i>mad211</i></b>	MAD2 mitotic arrest deficient-like 1 gén
<b><i>mis12</i></b>	MIS12 kinetochore complex component gén

<b>ML-1</b>	humán akut mieloid leukémia sejtvonal
<b>mRNS</b>	hírvivő ( <i>messenger</i> ) ribonukleinsav
<b>MSDI</b>	maximális számított beviteli érték ( <i>maximized survey-derived intake</i> )
<b>MSZ</b>	magyar szabvány
<b>MX</b>	3-kloro-4-(diklorometil)-5-hidroxi-2(5H)-furanon
<b><i>ndc80</i></b>	NDC80 kinetochore complex component gén
<b>NDMA</b>	N-nitrozodimetilamin
<b>NCI</b>	amerikai Nemzeti Rákkutató Intézet ( <i>National Cancer Institute</i> )
<b>NHIK 3025</b>	humán méhnyak adenokarcinóma sejtvonal
<b><i>nuf2</i></b>	UF2 component of NDC80 kinetochore complex gén
<b><i>nusap1</i></b>	nucleolar and spindle associated protein 1 gén
<b>OECD</b>	Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet ( <i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i> )
<b>PCA</b>	főkomponens analízis ( <i>principal component analysis</i> )
<b>PCR</b>	polimeráz láncreakció ( <i>polymerase chain reaction</i> )
<b>PE</b>	perikardiális ödéma
<b><i>plk1</i></b>	polo-like kinase 1 gén
<b>QSTR</b>	kvantitatív szerkezet-toxicitás kapcsolat vizsgálat ( <i>quantitative structure-toxicity relationship analysis</i> )
<b>REACH</b>	vegyi anyagok regisztrációja, értékelése, engedélyezése és korlátozása ( <i>Registration, Evaluation, Authorisation of Chemicals</i> )
<b>RNS</b>	ribonukleinsav
<b>SCE</b>	testvér-kromatida kicserélődés ( <i>sister chromatide exchange</i> )
<b>SCGE</b>	egysejtes gélelektroforézis vizsgálat ( <i>single cell gel electrophoresis</i> )
<b><i>sgo1</i></b>	shugoshin 1 gén
<b>SMART</b>	szomatikus mutációs és rekombinációs teszt ( <i>somatic mutation and recombination test</i> )
<b>SSB</b>	egyszálú DNS-törés ( <i>single strand break</i> )
<b>ox-MX</b>	a 3-kloro-4-(diklorometil)-5-hidroxi-2(5H)-furanon oxidált formája
<b>red-MX</b>	a 3-kloro-4-(diklorometil)-5-hidroxi-2(5H)-furanon redukált formája
<b>T98G</b>	humán glioblasztóma multiforma sejtvonal
<b>TC</b>	farok görbület

<b>Tg(vtg1:mCherry)</b>	vitellogenin-1 promótert hordozó, májban ösztrogénhatásra vörös fluoreszcens fehérjét (mCherry) kifejező transzgenikus zebradánió vonal
<b>THM</b>	trihalometán-származékok
<b>TK</b>	timidin-kináz
<b>TM</b>	faroktorzulás
<b>ttk</b>	ttk protein kinase gén
<b>U87MG</b>	humán glióma sejt vonal
<b>UFZ</b>	Helmholtz Környezetkutató Központ ( <i>Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung</i> )
<b>USA</b>	Amerikai Egyesült Államok ( <i>United States of America</i> )
<b>US EPA</b>	az Amerikai Egyesült Államok Környezetvédelmi Hivatala ( <i>United States Environmental Protection Agency</i> )
<b>WHO</b>	Egészségügyi Világszervezet ( <i>World Health Organization</i> )
<b>YC</b>	elszíneződött szik



## 2. Bevezetés és célkitűzés

A víz a földi lét alapja, valamint az emberiség fejlődésének mozgatórugója. Ezzel együtt azonban egyre nő az emberiség vízigénye, viszont az ipari és társadalmi fejlődés komoly károkat okozott a Föld vízkészletében. Talán pont a nagymértékű fejlődésnek, iparosodásnak köszönhetően egyre nehezebb megfelelő minőségű és mennyiségű ivóvízhez jutni.

A világ különböző területein élő emberek eltérő, ivóvízzel kapcsolatos problémákkal néznek szembe. A fejlődő országok lakói küzdenek az éhínséggel, hiszen víz hiányában nem tudnak elegendő élelmiszert előállítani. A vízhiány mellett hatalmas probléma a rendelkezésre álló vízforrások szennyezettsége is. Számos betegség (malária, tífusz, szalmonellózis, hepatitisz, *Escherichia coli* fertőzés) szedi áldozatát ezen országokban, mert nem állnak rendelkezésre a megfelelő higiéniai körülmények. A biológiai veszélyforrások mellett ezekben az országokban az ipari szennyezés is számottevő, a laza vagy éppen be nem tartott környezetvédelmi előírások miatt.

A fejlett országokban a vízforrások rendelkezésre állnak ugyan, de napjaink modern életvitelének köszönhetően el is szennyeződnek. Ezekon a területeken az ipar és a mezőgazdaság a két legjelentősebb szennyező forrás. Fontos megemlíteni, hogy a háztartásokból is számos szennyezőanyag kerül a környezetünkbe (Kolpin et al. 2002). Egy részük a mindennapi használat során, úgy, mint a mosószerek, a kozmetikumok és a gyógyszermaradványok. Ezek a szennyezők közvetlenül a szennyvízzel is bekerülhetnek a vízbázisba, de nem ritka az sem, hogy helytelen hulladékkezelés következtében jutnak be a víz természetes körforgásába. Ezen anyagok eltávolítására, valamint a vízzel terjedő betegségek megelőzésére különböző víztisztítási procedúráknak vetik alá a települések szennyvizét és az ivóvíz előállítás során a nyersvizet. Ezen eljárások bár fejlettek, mégsem alkalmasak például számos, endokrin rendszert zavaró anyag (EDC-*endocrine disrupting compound*) eltávolítására (Bakos et al. 2013).

A víztisztítás során keletkező melléktermék vegyületek (DBP- *disinfection by-product*) jelenlétére és vizsgálatának fontosságára először a holland vegyész, Johannes Rook munkássága irányította a figyelmet. Az elmúlt néhány évtizedben több, mint 600 anyagról derült ki, hogy a vízkezelés során keletkezik, ezeknek azonban csak töredékéhez rendeltek határértéket a hatályos szabályozásokban (98/83/EK rendelet, 201/2001. (X.25.) Kormányrendelet), számos anyag toxikológiai vonatkozásairól a mai napig nem áll rendelkezésünkre elegendő információ.

Bár az elmúlt években számos publikáció jelent meg a DBP-kel kapcsolatban, még mindig kevés figyelmet kap ez a témakör. Ennek számos oka lehet, például az, hogy kémiaiag nagyon sokféle vegyület sorolható ebbe a csoportba, nagyon alacsony koncentrációban található meg a természetes vízbázisokban és az ivóvízben, így nehéz a kimutatásuk, még a mai, modern analitikai módszerek alkalmazásával is. A kezeletlen ivóvízzel szemben, mely számos betegség terjesztője lehet, akut problémát általában nem okoznak sem az élővilágban, sem pedig a fogyasztókban. Igazi

veszélyük ebben rejlik, hiszen a káros hatások kialakulásához évek vagy évtizedek is kellhetnek. A fogyasztók mindennapi életük során ki vannak téve ezen vegyületek hatásainak, nem csupán az ivóvíz közvetlen fogyasztásával, hanem például zuhanyzás közben is, ahol apró cseppek formájában közvetlenül a tüdőbe kerül a víz, ezáltal a melléktermék vegyületek is (Uddameri & Venkataraman 2013).

A probléma tehát nagyon összetett, kiderült, hogy a vízben található oldott szervesanyag (DOM- *dissolved organic matter*) mellett a korábban a vízbázisba került vegyületekből is kialakulhatnak DBP-k. Ilyenek lehetnek a gyógyszer-hatóanyagok, melyek közül számos olyan van, melyet nagy mennyiségben használ a lakosság. Ide sorolhatjuk a hormonális fogamzásgátló készítményeket, csontritkulás elleni szereket és mennyiségüket tekintve a legtöbbit alkalmazott fájdalomcsillapító, gyulladáscsökkentő szereket. A széleskörben használt antibiotikumok közül több csoportról (tetraciklinek, flurokinolonok,  $\beta$ -laktámok) kimutatták, hogy képesek reakcióba lépni a klórvegyületekkel (Wang et al. 2011, Dodd et al. 2005).

A gyulladáscsökkentő, fájdalomcsillapító készítmények jelentős részéhez vény nélkül kapható készítmények formájában is hozzájuthat a lakosság, így helytelen hulladékkezelés következtében is könnyen bejuthatnak a vizekbe. Világszerte a legnagyobb mennyiségben előállított hatóanyag az ibuprofén (2-(4-izobutilfenil)-propionsav), mely  $\mu\text{g/l}$ -es koncentráció tartományban található meg a természetes vizekben. Ami aggasztó ezzel a hatóanyaggal kapcsolatban, hogy bomlástermékeivel együtt megtalálható a szennyvíztisztító telepek elfolyóvizében, szintén  $\mu\text{g/l}$ -es koncentráció tartományban (Fent et al. 2006). Az anyamolekulából hőközlés, valamint oxidatív kezelés hatására számos bomlástermék keletkezik, köztük a dolgozatban vizsgált 4-etilbenzaldehyd (EBA) (Madhavan et al. 2010). Mivel az ivóvíz kezelés során mind hő-, mind oxidatív hatásnak ki van téve a nyers víz, ez tehát a legvalószínűbb módja annak, ahogy az EBA bekerül a vízrendszerbe. A vegyületről kevésbé ismert tény, hogy az íz- és illatanyagok között megtalálható a vegyszerforgalmazók termékpalettáján, hiszen a mesterséges mandula aromához, a benzaldehydhez hasonlóan, mandula illattal rendelkezik. Illatanyagként természetes módon előfordul növényi és állati eredetű termékekben, úgy, mint salátában, zöldbabban, tengeri kagyló- és halfélékben (Lonchamp et al. 2009, Barra et al. 2007, Triqui & Reineccius 1995), ám a benzaldehyddel ellentétben biztonsági adatlapja nem tartalmaz toxikológiai információkat. Az EFSA (*European Food Safety Authority*- Európai Élelmiszerbiztonsági Hatóság) 2012-ben megjelent, az ízesítő anyagokról készült tudományos véleményében nem fogalmaztak meg biztonsági aggályokat az anyaggal kapcsolatban. Azért meglepő mindez, mert ebben a dokumentumban mindössze egy, az EBA toxicitásával kapcsolatos, ám meg sem jelent („*unpublished*”) publikációt említenek. Az EFSA az anyag MSDI (*maximized survey- derived intake* – maximális számított beviteli érték) értékét  $0,37 \mu\text{g}/\text{fő}/\text{nap}$ -ban határozta meg (EFSA

2012). A tudományos szakirodalomban fellelhető információk szerint az anyagot eddig kizárólag Rácz és munkatársai (2012) vizsgálták gerinces modell szervezeten, mely esetükben a zebradánió volt, adult életszakaszban. Mivel az EBA az egyik leggyakrabban használt gyógyszer hatóanyag, az ibuprofén bomlásterméke, mely szennyvíztisztítás után is megtalálható az elfolyóvízben, ezért kiemelten fontos feltérképezni az élő szervezetekre gyakorolt hatását. Bár az EFSA megállapított egy MSDI értéket, ám mint azt láthatjuk, számos forrásból bejuthat az emberi szervezetbe, így könnyen toxikus hatást fejthet ki.

Dolgozatomban az EBA mellett egy másik DBP vegyületet is vizsgáltam, a 2-4-difluoroanilint (DFA). Ezt az anyagot intermediereként használják gyógyszerek, festékek és növényvédőszer gyártásakor. Akut esetekben methemoglobinémiát okoz, valamint erősen nefrotoxikus (Eadsforth et al. 1984, Lo et al. 1990, 1991). Az anyaggal kapcsolatban több humán vonatkozású eredmény látott napvilágot, melyekben főként a vegyszergyárakban dolgozó munkások vérmintáinak vizsgálatával foglalkoztak. Az EBA-hoz hasonlóan Rácz és munkatársai (2012) ezt a vegyületet is vizsgálták kifejlett zebradánió egyedeken, ám embriókra gyakorolt hatását még nem tanulmányozták, ahogy más kutatók sem.

Mivel a halak egész életciklusukat a vízben töltik, ezért kiváló modellállatai az ilyen jellegű vizsgálatoknak, a zebradánió pedig egy nemzetközileg elfogadott és jól ismert modell szervezet. Mint azt láthatjuk, kifejlett életszakaszra vonatkozóan már rendelkezésre áll néhány információ az anyagok hatásairól, ám a korai életszakaszokról nem. Vizsgálataim során mind az EBA, mind a DFA esetén kiemelten fontosnak tartottam az embriók vizsgálatát, hiszen az anyagok fejlődésbiológiai hatásairól nem áll rendelkezésünkre információ. Ezek a kísérletek jó kiindulópontjai lehetnek humán egészségügyi vizsgálatoknak, kiváltképp a halembriókon végzett microarray vizsgálat, mely az embrionális fejlődés során végbemenő, génexpresszióban bekövetkező változásokat hivatott feltárni.

Munkám célja az volt, hogy megismerjem két víztisztítási melléktermék vegyület, az EBA és a DFA zebradánió embriókra gyakorolt hatásait. Az EBA-ról nagyon kevés információval rendelkezünk, illetve aggasztó, hogy az egyik leggyakrabban használt fájdalomcsillapító hatóanyag, az ibuprofén bomlástermékeként is létrejöhet a vízkezelés során, továbbá íz-és illatanyagként is hozzáférhető. Céлом volt megvizsgálni az EBA és a DFA embriófejlődésre gyakorolt hatásait, valamint meghatározni az akut tesztek során a vegyületek LC (LC<sub>x</sub>- az egyedek X%-ának pusztulását okozó koncentráció) értékeit. Továbbá céлом volt az EBA génexpresszióra gyakorolt hatásának vizsgálata microarray assay alkalmazásával. Választ szerettem volna kapni arra, hogy a transzkriptom analízis során kapott eredményt alá tudom-e támasztani különböző, klasszikus toxikológiai vizsgálatokkal, így gyarapítva az EBA-ról rendelkezésre álló toxikológiai információk mennyiségét.

### 3. Irodalmi áttekintés

#### 3.1. Az ivóvíz jelentősége, az ivóvízzel kapcsolatos globális egészségügyi problémák

A víz nem csupán a földi lét alapja, de az emberiség fejlődésének egyik mozgatórugója is. Bolygónk növekvő lakosságát egyre nehezebb ellátni jó minőségű és megfelelő mennyiségű ételmiszerrel, a nagy volumenek előállításához iparszerű gazdálkodásra van szükség, ehhez rengeteg vízre. Sajnos ezen tevékenységek nagymértékű vízszennyezéssel járnak, mely az ivóvízbázisokat is érinti. A mezőgazdasági, ipari és kommunális szennyezések miatt a természetes vizek jelentős része alkalmatlan közvetlen emberi fogyasztásra. Ennek következtében a víz stratégiai fontosságúvá vált világszerte (Alcamo et al. 2007; Pahl-Wostl et al. 2008; Al-Saidi & Elagib 2017)

A Földön lévő víz mennyiségét 1,4 milliárd köbkilométerre becsülik, melynek csupán 0,003%-a használható fel ivóvízként, higiéniai, mezőgazdasági és ipari célokra. Ha a népesség a mostani ütemben növekszik, kétséges, hogy 2030-ra elegendő víz lesz az emberiség fenntartásához. A FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*- Egyesült Nemzetek Élelmezésügyi és Mezőgazdasági Szervezete) felmérése szerint a legtöbb vizet igénylő iparág a mezőgazdaság. Minden kilogramm gabona előállításához 1000-3000 liter víz szükséges. Az egy emberre jutó ivóvíz felhasználás nem csupán a közvetlen fogyasztást jelenti, hiszen 2-5000 liter víz szükséges egy ember egy napi ételmiszerének előállításához (FAO 2017).

A vízkészletek eloszlása nem egyenletes, vannak olyan régiók, ahol szinte pazarolják a vizet, míg máshol emberek tízezrei halnak meg naponta, a vízhiányra visszavezethetően. A fejlődő országokban óriási problémát jelent az éhínség, hiszen víz hiányában nem tudnak elegendő ételmiszert előállítani. Számos betegség (malária, tífusz, szalmonellózis, hepatitisz, *Escherichia coli* fertőzés) szedi áldozatát ezen országokban, mert nem állnak rendelkezésre a megfelelő higiéniai körülmények.

A fejlett országok egészen más problémákkal néznek szembe. Itt a vízforrások rendelkezésre állnak ugyan, de a nagymértékű iparosodásnak köszönhetően el is szennyeződnek. Az iparon és a mezőgazdaságon kívül számos szennyezőanyag, mosószerek, vegyszerek, gyógyszermaradványok is bekerülnek a vizekbe. Ezen anyagok eltávolítására, valamint a vízzel terjedő betegségek megelőzésére különböző víztisztítási procedúráknak vetik alá a települések szennyvizét. Ezen eljárások bár modernnek, mégsem alkalmasak például számos endokrin rendszert zavaró anyag eltávolítására. Az EDC vegyületek eltolják a hormonok természetes egyensúlyát az élő szervezetekben, hatással vannak a szaporodásra és az egyedfejlődésre, valamint a természetes hormonok analógjaiként működve számos káros biológiai hatást (például torzulások, fejlődési zavarok) eredményeznek (Bakos et al. 2013).

Napjainkban egyre nagyobb figyelmet kapnak a toxikológiában az ivóvíz fertőtlenítése közben képződő vegyületek. A jó minőségű, káros szennyezőanyagoktól mentes ivóvíz biztosítása világszerte, így hazánkban is létfontosságú, stratégiai feladattá vált. A jelenleg alkalmazott víztisztítási eljárások (klór, klór-dioxid, UV, illetve ózon kezelés) elsősorban a vízben levő kórokozók elpusztítását szolgálják, ezen túlmenően a különböző szűrési módszerekkel igyekeznek a kémiai szennyeződések mérsékelni.

Az oxidáló fertőtlenítőszerrel élettelen anyagokkal is reagálhatnak az ivóvízben és a dezinfekció nyilvánvaló előnyei mellett, a fenti kémiai beavatkozások nyomán számos szerves vegyület keletkezik (víztisztítási-reakciómelléktermékek), melyeknek káros, elsősorban mutagén (Sujbert et al. 1993) és karcinogén hatása lehet (Bull et al. 1995).

Az emberek egészségének, valamint a környezet állapotának megóvása érdekében napjainkban egyre fontosabbak a laboratóriumi vizsgálatok. Bizonyos vegyületek vagy környezeti minták hatását legbiztonságosabban így térképezhetjük fel. Ahhoz, hogy egy vegyület környezeti hatásáról komplex képet kapjunk, fontos, hogy az alsóbbrendű élőlényektől a gerincesek felé haladva minél több fajról álljon rendelkezésünkre információ.

Az ivóvíz kórokozókkal történő szennyeződése hozzájárul bizonyos betegségek gyors és nagy tömegeket érintő terjedéséhez, így vektor jellege miatt különösen veszélyes a kontaminációja. Az ivóvíz előállítás alapjául szolgáló nyersvízben is számtalan különböző mikroorganizmus fordul elő. Ezek lehetnek algák, férgek, baktériumok, protozoák vagy vírusok (Momba & Kaleni 2002, Stanger et al. 2006, Locas et al. 2007). Az ivóvízzel terjedő legismertebb baktérium törzseket Crittenden et al. (2005) nyomán az 1. táblázat mutatja be.

1. táblázat *A legismertebb, ivóvízben előforduló, megbetegedéseket okozó baktérium törzsek*  
*Crittenden et al. (2005) nyomán*

	Mikroorganizmus	Megbetegedés típusa		
Ismert kórokozók	<i>Salmonella typhosa</i>	hastífusz		
	<i>S. paratyphi</i> <i>S. schottinuleri</i> <i>S. hirschfeldi</i> C.	paratífusz		
	<i>Shigella flexneri</i> <i>Sh. disenteriae</i> <i>Sh. sonnei</i> <i>Sh. paradysintiae</i>	vérhas		
	<i>Vibrio comma</i> <i>V. cholerae</i>	kolera		
	<i>Pasteurella tularensis</i>	tularemia		
	<i>Brucella melitensis</i>	brucellózis		
	<i>Pseudomonas pseudomallei</i>	meliooidosis		
	<i>Leptospira icterohaemorrhagiae</i>	leptospirózis		
	<i>Enteropathogenic E. coli</i>	gasztroenteritisz		
	Vízben már kimutatott kórokozók	<i>Enteroaggregative E. coli</i> <i>Enteroinvasive E. coli</i> <i>Enterohemorrhagic E. coli</i> <i>Enterotoxigenic E. coli</i> <i>Yersinia enterocolitica</i> <i>Campylobacter jejuni</i>	gasztroenteritisz	
		Feltételezeten vízben terjedő kórokozók	<i>Legionella pneumophila</i>	legionellózis
			<i>Aeromonas hydrophila</i>	gasztroenteritisz
<i>Helicobacter pylori</i>			gyomor és nyombélfekély, gyomorrák	
<i>Mycobacterium avium intracellulare</i>			pneumónia	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			különböző fertőzések	

Az Egészségügyi Világszervezet (WHO-*World Health Organization*) 2018-ban közölt információi szerint ([http1](#)) 2015-ben globálisan 5,2 milliárd ember jutott hozzá biztonságosan kezelt ivóvízhez, és aggasztó tény, hogy közel 2 milliárd ember fogyasztott fekáliával szennyezett ivóvizet. Az alacsony és közepes jövedelmű, fejlődő országokban az egészségügyi ellátó helyek közel 38%-ában nincs megfelelő minőségű vízforrás, 19%-ukban nem kielégítőek a higiénés körülmények, 35%-ukban még a kézmosáshoz szükséges szappan és víz is hiányzik.

A felsorolt tények fényében nem meglepő, hogy a leggyakoribb vízzel terjedő betegségek többnyire a fejlődő országokban ütik fel a fejüket időről időre. A fejlett országokban is előfordulnak ilyen jellegű megbetegedések, de többnyire kis területre korlátozódva, általában valamilyen környezeti katasztrófa következtében, esetleg trópusi országokba történő utazással behurcolva, pontszerűen. Nagy esőzések, áradások, gátszakadások alkalmával fordul elő általában az ivóvízbázis, lakóingatlanok, termőföldek elszennyeződése kommunális szennyvízzel, ezáltal fekális baktériumok sokaságával. A mikroorganizmusokkal szennyezett vízzel terjedő betegségek különösen nagy halálozási arányt okoznak a 0-5 éves gyermekek estében. Évente 900 millió, ebbe a korcsoportba tartozó gyermek hasmenéses megbetegedését tulajdonítják a szennyezett víznek, és 1,5 – 1,8 millió gyermek halálát okozza a szennyezett víz fogyasztása (Ashbolt 2004). A WHO adatai szerint az össznépeséget tekintve 2,2 millió ember hal meg napjainkban az erős hasmenéssel járó betegségekben, főként kanyaróban, maláriában, kolerában és vérhasban. Ez Délkelet-Ázsiában a halálesetek 8,5%-át, míg Afrikában a 7,7%-át jelenti ([http2](#)).

### **3.2. Az ivóvíz kezelése, fertőtlenítése**

#### **3.2.1. Nyersvíz források az ivóvíz ellátásban**

Az ivóvíz kezelésének jelentősége megkérdőjelezhetetlen a fent leírtak alapján. A kezelések elsődleges célja az egészségügyi kockázatot nem jelentő ivóvíz előállítása a rendelkezésre álló nyersvíz források felhasználásával. A víz a körforgása során érintkezik a litoszférával, az atmoszférával, valamint a bioszférával, így számos nem kívánatos szerves és szervetlen anyag kerülhet bele. A vizet érő talán legveszélyesebb hatások antropogén eredetűek, hiszen a modern társadalom számtalan kemikáliát juttat a környezetbe.

A nyersvíz források sokfélék lehetnek, ezért az egyes forrásokból származó vizek kezelésében is lehet különbség. A felszín alatti vízforrások közül a legveszélyeztetettebbek a talajvizek, azaz az első vízzáró réteg fölötti vízréteg. Napjainkban a vízellátási célú vízhasználatnak csak kevesebb, mint 10%-át adják. A rétegvizek, vagy mélységi vizek, két vízzáró réteg között, néhány tíz métertől akár az ezer métert meghaladó mélységig több, egymással nem összekapcsolódó rétegben találhatóak. A felszín felől érkező szennyezéseknek kevésbé vannak kitéve, ám a felszín közeli rétegekre olykor jellemző a nitrát tartalom és a bakteriális

szennyezettség is. Általában nagyobb mennyiségben tartalmaznak oldott sókat, valamint gyakran található bennük fölösleges szén-dioxid és metán. A fogyasztók szempontjából aggályos, hogy a dél-alföldi rétegvizek gyakran magas koncentrációban tartalmaznak arzént. A rétegvizek a vízellátási célú vízhasználat több, mint 40%-át adják. A karsztvizek vízkészleteink közül a legjobb minőségűek között vannak. Jellemzően mészkő- és dolomit tartalmú kőzetekből származnak, amelyből kalcium és magnézium sókat oldanak ki, ezért nagyobb a keménységük, kevés szerves anyag, vas és mangán található bennük. Vízellátási szempontból fontos karsztvíz lelőhelyek vannak a bükki karszt és Aggtelek környékén, valamint az észak-balatoni régióban. A vízellátási célú vízhasználat 20%-át biztosítják. A forrásvizek viszonylag jó minőségűek, ám a vízellátásban kicsi a szerepük, hiszen kevés olyan forrás van hazánk területén, mely egész évben, viszonylag egyenletes hozammal, jelentősebb mennyiségű vizet tudna szolgáltatni. Külön kategóriát alkotnak a parti szűrésű vizek, hiszen eredetüket tekintve felszíni vizek, melyek több tíz méter vastagságú mederanyagon (homokos kavics, kavics) szivárognak át, így a természetes talajszűrés által javul a minőségük. Ezen vizek minőségét jelentősen befolyásolja a felszíni víz minősége, a parti talajréteg (mederanyag) szűrőhatása és az esetleg hozzákeveredő talajvíz minősége, ami szoros összefüggésben van az antropogén hatásra bekövetkező környezetterheléssel. A Dráva mentén, valamint a Duna kavicssteraszain, jellemzően a Szigetköz és Budapest környékén rendelkezik hazánk ilyen vizekkel. A vízigények kielégítéséhez 30%-ban járulnak hozzá ezek a források (Urbanovszky 2017). A tény, hogy éppen a Főváros környékén, Európa egyik legnagyobb, iparilag is jelentős városokon áthaladó folyójából nyerünk ilyen módon ivóvizet aggasztó, hiszen maga a felszíni forrás, a Duna is számos szennyező hatásnak van kitéve, és a mederanyagon való áthaladáskor belekeveredő talajvíz is szennyezett lehet. A dolgozat előzményeként szolgáló kutatásokban is ilyen kutakból származó, budapesti ivóvizet vizsgáltak, és tárták fel annak genotoxikus hatását baktériumokra nézve (Sujbert et al. 1993) és apoptotikus aktivitást növelő (Rác et al. 2004) hatását sejttenyészetten.

### **3.2.2. Az ivóvíz kezelése**

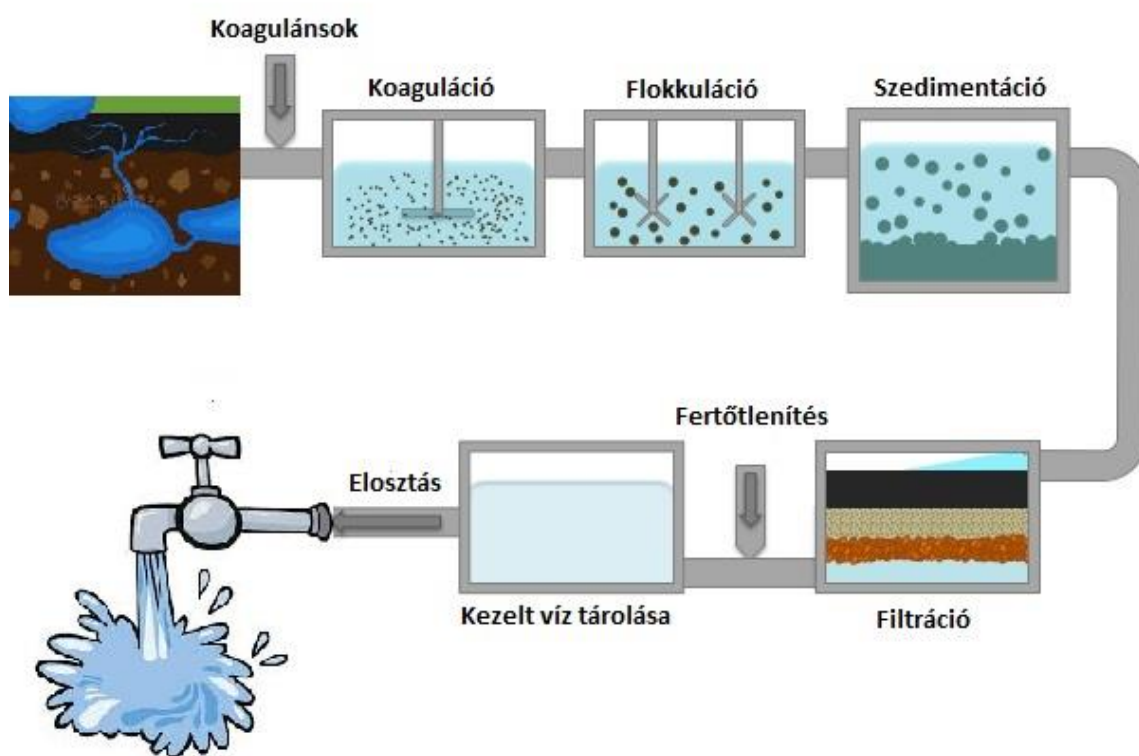
A 3.1. fejezetben leírt betegségek számos alkalommal okoztak járványokat az emberiség történelmében, és okoznak napjainkban is, főként a fejlődő országokban. Az ivóvizek fertőtlenítése, a tény, hogy a nyersvizet meg tudjuk szabadítani a kórokozóktól, az elmúlt évszázad egyik legnagyobb közegészségügyi vívmánya.

Bár a 17. században Leeuwenhoek saját készítésű nagyító lencsési segítségével felfedezte a vízben megtalálható mikroorganizmusokat (Smit & Heniger 1975), ezeket egészen a XIX. század közepéig nem hozták összefüggésbe a betegségek terjedésével. 1854-ben ugyanis a londoni Soho negyedben kitört egy nagy kolera járvány, melynek során Dr. John Snow az esetek előfordulását térképen dokumentálta, lokalizálva ezzel a probléma forrását. Vizsgálatai során kiderült, hogy a



fertőzési góc a Broad Street-en található kút, így bizonyította be, hogy a betegség egyértelműen a vízzel terjed (Brody et al. 2000). A víz kezelését sokáig csak az egyszerű mechanikai szűrés jelentette. A klór, mint vízfertőtlenítő szer első dokumentált alkalmazását Robley Dunlinsen 1835-ben írt, Public Health című művében leheljük fel (Crittenden et al. 2005), ám hatékonyságát tudományosan csak 1881-ben bizonyította be Robert Koch (Howard-Jones 1984).

Az ivóvíz kezelése bonyolult, több lépcsős folyamat, melynek során a nyersvizet megtisztítják a mechanikai, kémiai és biológiai szennyeződésektől. A hagyományos vízkezelési folyamat fő lépései a szűrés, ezt követi a derítés, az üleptetés, ismételt szűrés, majd a víz fertőtlenítése (1. ábra). A víztisztítás eddigi rövid története során ezek a módszerek finomodtak, valamint a technológia is jelentősen fejlődött, ám alapjaiban igen keveset változott. A folyamat célja továbbra is a régi, azaz tiszta és biztonságos ivóvíz előállítása a lakosság számára (Dawson & Sartory 2000).



1. ábra Az ivóvíz kezelésének sematikus ábrája (<http3> alapján)

### 3.3. A fertőtlenítés során keletkező melléktermékek csoportosítása és toxikológiai megítélése

A víztisztítási melléktermék vegyületek felfedezése Johannes Rook, holland vegyész nevéhez fűződik. Rook a Rajna folyóból nyert vízmintákban fedezte fel kloroform jelenlétét. Megfigyelte, hogy ez a vegyület a nyersvízben nem volt jelen, ám a tisztítási folyamat végén már jelentős mennyiségben előfordult a vízben (Rook 1974, 1976). Eredményeiből azt a következtetést vont le, hogy a fertőtlenítésre használt klórvegyületek reagálnak a nyersvízben természetes módon előforduló oldott szerves anyaggal, így alakulhatott ki kloroform, valamint különböző trihalometán-származékok (THM). Ezt a következtetését a későbbiekben számos tanulmány alátámasztotta (Symons et al. 1975; Williams et al. 1980; Dotson et al. 2009; Leenheer & Croué 2003). A szerves anyag, mely főként kolloid mérettartományba tartozó, vizes fázisban oldott, biomassza eredetű anyagból áll, szinte minden természetes eredetű vízben jelen van. Eredete főként szárazföldi és vízi mikroszervezetek lebontó tevékenységére, szekunder szervesanyag-feldolgozást végző heterotróf szervezetek működésére, valamint fotoszintetizálni képes élőlények tevékenységére vezethető vissza (Rositano et al. 2001). A DOM és a melléktermékek kialakulása közötti kapcsolat mind Európában, mind pedig a tengerentúlon megdöbbenést váltott ki a tudományos közéletben, hiszen addig az volt az álláspont, hogy kezelés után az ivóvíz nem tartalmaz semmilyen, az egészségre ártalmas összetevőt. A kutatások száma ugrásszerűen megnövekedett ebben a témakörben, ezzel együtt az ismert DBP-k száma is, hiszen már igen korán, az 1970-es években egyértelművé vált, hogy ez a nagyon heterogén vegyületcsoport lehet a DBP-k kialakulásának elsődleges prekursora (Hrudey 2009). A DOM-hoz tartozó anyagokon kívül szerves szennyezők is szerepet játszanak a DBP-k kialakulásában, ezek közül legjelentősebbek a jodid-és bromidionok. Ezek azért különösen veszélyesek, mert hipobrómsavvá vagy hipojódossavvá alakulva könnyen reakcióba léphetnek a DOM-mal (Hua et al. 2006). A DBP-k külön csoportját alkotják azok a vegyületek, melyek emberi szennyezés hatására alakulnak ki. Ide sorolhatók a háztartásokból és a mezőgazdasági termelésből kikerülő kemikáliák, illetve a gyógyszer hatóanyag maradványok és bomlástermékek, valamint a fertőtlenítőszer reakciójából keletkező vegyületek. A biológiai és kémiai hatások feltérképezésével foglalkozó kutatócsoportok eredményeit a műszaki területen dolgozók is felhasználják, és olyan vízkezelési technológiák kifejlesztésén dolgoznak, melyek minimalizálják a klórvegyületek használatát, így megelőzve a DBP-k keletkezését. Napjainkban ezen technológiák közül az UV-fény, illetve a reverz ozmózis eljárás tűnik biztatónak, ám ezen módszerek még behatóbb vizsgálatokat igényelnek, hogy fény derüljön esetleges hátrányaikra. A nyersvízben található szerves anyag miatt azonban az új technológiák is rejthetnek veszélyeket, új DBP csoportok alakulhatnak ki. Ezekről a csoportokból

a következő fejezetekben lesz szó, melyet Richardson & Postigo (2011) által készített csoportosítás alapján állítottam össze.

### 3.3.1. Szabályozás hatálya alá eső víztisztítási melléktermék vegyületek

Mivel számos mikrobiológiai és kémiai veszély fenyegeti a fogyasztókat az ivóvíz fogyasztással kapcsolatban, így az országok igyekeznek kellően szigorú és átgondolt szabályozásokat alkotni az ivóvízzel szemben támasztott követelményeket illetően. Ez hazánkban sincs másként. A továbbiakban a hazánkban alkalmazandó paramétereket részletezem.

Az Európai Közösségek Tanácsa 1975-ben kiadott egy irányelvet az ivóvízkivételre szánt felszíni vizek minőségi követelményeiről a tagállamoknak, majd ezt a rendeletet írta felül a 98/83/EK Irányelv az emberi fogyasztásra szánt víz minőségéről, melyet 1998-ban adtak ki, és máig hatályos. A tagországoknak a megfelelő türelmi idők mellett vállalniuk kell a kívánt vízminőség elérését. Magyarország a csatlakozással vállalta az irányelvben foglalt paraméterek teljesítését.

A magyar jogalkotás jogszabályi szinten szabályozza az ivóvízre vonatkozó követelményeket (201/2001. (X.25.) Kormányrendelet az ivóvíz minőségi követelményeiről és az ellenőrzés rendjéről). A jogszabály bevezetését megelőzően szabványban rögzítették az ivóvíz minőségével kapcsolatos előírásokat (MSZ 450/1-1989). Vannak olyan határértékek, melyek a kormányrendeletben jelentősen megváltoztak a szabványhoz képest (2.táblázat).

2. táblázat Néhány fontosabb vízparaméterre vonatkozó határérték az MSZ 450/1-1989 szabvány, valamint a 201/2001. Kormányrendelet alapján

Összetevő	Mértékegység	MSZ 450/1-1989	201/2001 (X.25.) Korm. rendelet
Nitrit	mg/l	0,5-1	0,5
Nitrát	mg/l	20	50
Ammónium	mg/l	1	0,5
Vas	mg/l	0,2	0,2
Mangán	mg/l	0,1	0,05
Bór	mg/l	1-5	1
Fluorid	mg/l	1,5	1,5
Arzén	µg/l	50	10

Miután számos vizsgálatban fény derült a DBP-k jelenlétére az ivóvízben, illetve egyes DBP-k potenciális egészségkárosító hatásaira, az egyes nemzetek és közösségek a vízminőségi

követelmények fontos részévé tették a melléktermék vegyületek alacsony mennyiségét. Az Egyesült Államok Környezetvédelmi Hivatala (US EPA) (EPA 63 FR 69390) és az Európai Unió is irányelvben rögzítette a tagállamoktól elvárt határértéket, valamint a WHO is bevezette irányelveibe néhány DBP maximális megengedhető szintjét. Mivel napjainkban már több, mint 600 melléktermék vegyületet ismer a tudomány (Richardson&Postigo 2011), melyeknek csak egy része került eddig górcső alá toxikológiai szempontból, így lehetetlen minden anyagra határértéket bevezetni. Más vegyületcsoportokhoz hasonlóan a DBP-k esetében is úgynevezett „jelző” vegyületekre állapítottak meg határértékeket, melyek többnyire vegyületcsoportjuk legnagyobb mennyiségben jelen lévő képviselői. A 3. táblázatban mutatom be a hatályos határértékeket, az azokat megállapító szervezetek szerint felsorolva.

*3. táblázat Az EPA, az EU és a WHO által megállapított irányadó határértékek a leggyakrabban és legnagyobb mennyiségben előforduló víztisztítási melléktermék vegyületekre vonatkozóan.*

<b>EURÓPAI UNIÓS HATÁRÉRTÉKEK (98/83/EK SZERINT)</b>	<b>HATÁRÉRTÉK (MG/L)</b>
<b>ÖSSZES THM</b>	0,1
<b>BROMÁT</b>	0,01
<b>WHO IRÁNYELVEK</b>	
<b>KLOROFORM</b>	0,3
<b>BROMO-DIKLORO-METÁN</b>	0,06
<b>KLORO-DIBROMO-METÁN</b>	0,1
<b>BROMOFORM</b>	0,1
<b>SZÉN-TETRAKLORID</b>	0,004
<b>KLOROECETSAV</b>	0,02
<b>DIKLORO-ECETSAV</b>	0,05
<b>TRIKLORO-ECETAV</b>	0,2
<b>BROMÁT</b>	0,01
<b>KLORIT</b>	0,7
<b>DIKLORO-ACETONITRIL</b>	0,02
<b>DIBROMO-ACETONITRIL</b>	0,07
<b>CIANOGEN KLORID</b>	0,07
<b>2,4,6-TRIKLOROFENOL</b>	0,2
<b>N-NITROZODIMETILAMIN</b>	0,1

US EPA SZABÁLYOZÁS	
<b>ÖSSZES THM (KLOROFORM, BROMO-DIKLOROMETÁN, KLORO-DIBROMOMETÁN, BROMOFORM)</b>	0,08
<b>5 HALOECETSAV (KLORO-, BROMO-, DIKLORO-, DIBROMO-, TRIKLORO-ECETSAV)</b>	0,06
<b>BROMÁT</b>	0,01
<b>KLORIT</b>	1

Mint az jól látszik, az EPA és az EU (Európai Unió) teljes THM mennyiségre állapít meg határértéket, ám az amerikai határérték szigorúbb, mint az európai. A WHO irányelvekben több THM vegyületre adnak meg határértéket, ám külön-külön egyik sem magasabb, mint az EU által előírt. Az EPA, valamint a WHO határértéket állapított meg a haloecetsav-tartalomra is, előbbi ebben az esetben is külön-külön is hozzárendel határértéket az egyes vegyületekhez, míg utóbbinál a THM-ekhez hasonlóan a vegyületcsoportra vonatkozik a 0,06 mg/l érték. Az EU szabályozása ennél lazábbnak mondható, hiszen a THM-ek mennyiségén kívül csak a bromát mennyiségét szabályozzák a vonatkozó 98/83/EK irányelvben.

A THM és HAA (haloecetsavak) vegyületek elsősorban klór és klóramin alkalmazása, a klorit klór-dioxid, míg a bromát többnyire ózonnal történő kezelés hatására alakulnak ki az ivóvízben. Mivel a klór használata miatt keletkezik a legnagyobb mennyiségű melléktermék vegyület, így a vízművek világszerte kénytelenek áttérni alternatív megoldások alkalmazására. Ezek a megoldások lehetnek például: ózon, klór-dioxid, klóramin vagy UV. Az ilyen, „alternatív” rendszerekben is használnak klórt, másodlagos fertőtlenítőszerként, azzal a céllal, hogy a vízvezeték rendszerben is ki tudjon fejteni fertőtlenítő hatást, megóvva ezzel a rendszer állapotát. Az új módszerek azonban új problémákhoz vezetnek, mert bár a felhasznált klór mennyiségének csökkentése a THM-ek és a HAA-k kisebb mértékű képződéséhez vezet, például az ózonnal történő kezelés jelentősen megnöveli a képződött bromátok mennyiségét, főként azokon a területeken, ahol a nyersvízforrások magas oldott anyag koncentrációval rendelkeznek. Ezek többnyire tengerpart közeli, folyóparti vagy ősi tengerek fölött helyezkednek el, ahol a vízbázis érintkezhet a magasabb oldott sótartalmú rétegekkel. A bromát nagy mennyiségben történő keletkezése azért aggasztó, mert hosszú távú kísérletben, *per os* adagolva, F344 típusú laboratóriumi patkányok esetében tumorok kialakulását figyelték meg kálium-bromát hatására (Kurokawa et al. 1986a).

Mivel a kloroformot fedezték fel leghamarabb az ivóvízben, így nem meglepő módon az egyik legtöbbet vizsgált DBP a mai napig. Megítélése sokat változott az évtizedek alatt. 1976-ban az amerikai Nemzeti Rákkutató Intézet (NCI- *National Cancer Institute*) által végzett, majd

publikált vizsgálatban azt az eredményt kapták, hogy a kloroform patkányokban (*Rattus norvegicus*) és egerekben (*Mus musculus*) máj és vese daganatokat okoz. Az eredmény igen ijesztőnek bizonyult, hiszen az FDA (*United States Food and Drug Administration*- az Egyesült Államok Élelmiszer- és Gyógyszerengedélyeztetési Hivatala) a tanulmány megjelenését követően 4 hónappal betiltotta a kloroform használatát kozmetikumokban. Ezt a döntést később felülvizsgálták, hiszen újabb tanulmányok rávilágítottak, hogy a kísérletekben alkalmazott dózis nagyon magas volt, és vivőanyagként víz helyett kukorica olajat használtak. Ha emberi dózissra számítjuk át az általuk alkalmazott dózist, 25 000-szer nagyobb mennyiséget kapunk, mint amit napi 2 liter 100 µg/l mennyiséget tartalmazó vízzel bevitelünk a szervezetünkbe egy egész élet alatt (Hrudey 2009). Hasonló eredmények születtek további három THM vegyülettel kapcsolatban is. A már említett olajos vivőanyagot használó kísérletben a kloro-dibromometán, a bromo-diklorometán és a tribromo-metán is megnövelte a rákos megbetegedések előfordulását egér és patkány tesztorganizmokon, majd a vízzel történő adagolás esetén nagyon alacsony volt a kialakuló elváltozások aránya a kontroll egyedekhez képest. A kloroformmal végzett kísérletekhez hasonlóan ezeknél az anyagoknál is szélsőségesen magas dózist használtak (Boorman et al. 1999).

Az évtizedek alatt elvégzett, sokszor ellentmondásos vizsgálatokat figyelembe véve az IARC (*International Agency for Research on Cancer* – Nemzetközi Rákkutató Ügynökség) a kloroformot, valamint a bromo-diklorometánt a 2B csoportba sorolta. Ebben a csoportban olyan anyagok szerepelnek, melyek lehetséges rákkeltők az emberi szervezetben, ám ez nem nyert bizonyítást kétséget kizáróan. A másik két említett vegyület, a bromoform, valamint a kloro-dibromometán a 3-as csoportban kapott helyet, így nem tekinthetők rákkeltőnek a tudomány jelenlegi állása szerint.

### **3.3.2. A szabályozás alá nem eső víztisztítási melléktermék vegyületek**

A szabályozás alá eső DBP-k mellett egyre nagyobb figyelem irányul ezekre a vegyületekre. Számos új DBP-t vontak már be *in silico* szerkezet-hatásmechanizmus elemzésbe, mely módszerekkel nagy biztonsággal következtethetünk egy-egy vegyület hatásmechanizmusára, potenciális karcinogenitására. Ezek között szerepelnek jódos savak, bromo-nitrometánok, jodo-trihalometánok, halofuranonok, halopirrolok, halokinonok, haloamidok, haloaldehidek, halonitrilek és nitrózaminok (Woo et al. 2002).

A fejezetben röviden bemutatom a legújabb kutatások eredményeiként felfedezett jelentősebb DBP-eket, valamint a kommunális eredetű szennyezéshez köthető vegyületeket. Ezek a vegyületek tovább növelik a téma komplexitását, hiszen jelenleg több tízezer vegyületet használ az emberiség az élet számos területén, így ezek a háztartásokból, a mezőgazdasági tevékenységből, a nehéz- és könnyűiparból, a közlekedésből és a vegyiparból, beleértve a gyógyszeripart,

kikerülhetnek és ki is kerülnek a környezetbe. Mivel bolygónk egy zárt rendszer, ezért vagy a levegőből kiülepedve vagy kimosódva, esetleg a talajba bemosódva, vagy a kommunális szennyvízzel eléri a természetes vízforrásokat, amik aztán ivóvízbázisunk alapját is adják.

### *Jódos savak és jodo-trihalometánok*

A jodoecetsavak, bár nem esnek hivatalos szabályozás alá, mégis nagy fenyegetést jelentenek az emberi egészségre. Ez idáig öt ilyen vegyületet mutattak ki a fogyasztásra kész ivóvízből: jodoecetsav, bromo-jodoecetsav, (Z)-3-bromo-3-jodopropénsav, (E)-3-bromo-3-jodopropénsav, (E)-2-jodo-3-metilbuténsav (Richardson et al. 2008a). A jodoecetsavról bebizonyosodott, hogy *in vitro* kísérletekben emlős sejtvonalakon DNS (dezoxiribonukleinsav) károsító hatása van, és ugyanabban a nM-os koncentráció tartományban *in vivo* teratológiai vizsgálatok során velőcső záródási rendellenességet idéz elő egér embriókon (Hunter & Tugman 1995, Hunter et al. 1996).

A jodo-trihalometánokat az 1970-es évek óta ismerik, mint DBP-eket. Hat vegyületet sorol ide a szakirodalom: dikloro-jodometán, bromo-kloro-jodometán, dibromo-jodometán, kloro-dijodometán, bromo-dijodometán, jodoform (Smith et al. 2010). A dikloro-jodometánt gyakran említi a szakirodalom az ötödik trihalometánként, utalva ezzel arra, hogy nem tartozik bele a határértékkel rendelkező, korábban már említett négy trihalometán vegyületbe. A jodo-trihalometánok koncentrációja a klórral vagy klóraminnal kezelt ivóvizekben a 15 µg/litert is meghaladhatja, ez az érték nem a csoportra vonatkozik, hanem az egyes vegyületekre értendő. Ezek a vegyületek egy egész országra kiterjedő amerikai kutatás szerint a klóraminnal kezelt amerikai ivóvizekben közel olyan mennyiségben keletkeznek, mint a határértékkel rendelkező THM-ek, ezen vegyületek mennyiségének mintegy 81%-át teszik ki (Krasner et al. 2006). Egészen 2008-ig nem vizsgálták a vegyületcsoport esetleges citotoxicitását és genotoxicitását, ám Richardson és munkatársai (2008a) megállapították, hogy mind a hat ismert jodo-THM citotoxikus, a kloro-dijodometán pedig erősen genotoxikus hatású emlős sejtekre. A jodo-THM csoport tehát egyértelműen egészségügyi kockázatokat rejt, hiszen egyrészt bizonyítottan sejt-és DNS-károsító hatásuk van, és nagy mennyiségben keletkeznek a klóraminos vízkezelés következtében.

### *Halonitrometánok*

A haloecetsavakhoz hasonlóan ebbe a csoportba is kilenc vegyület tartozik, a legtöbbször említett tagja a csoportnak a kloropikrin (trikolo-nitrometán), ám ivóvízben nem számít toxikusnak. Ezzel szemben a bromo-nitrometánok, melyek a klórozás előtt ózonnal kezelt vizekben találhatóak meg nagyobb mennyiségben, citotoxikusabbak és genotoxikusabbak, mint a

szabályozás alá eső DBP-k (Plewa et al. 2004, Krasner et al. 2006), koncentrációjuk vegyületenként a 3 µg/liter is elérheti (Krasner et al. 2006). A halonitrometán csoport vegyületei emellett mutagén hatásúnak bizonyultak *Salmonella* törzseken. A nitro-trihalometánok a THM-eknél tízszer citotoxikusabbak, ez a nagyságrendi különbség nagy valószínűséggel nitro-csoport nagyobb reaktivitásának köszönhető (Kundu et al. 2004).

### *Nitrózaminok*

A nitrózaminokat 2002-ben fedezték fel, mint DBP-eket, ettől fogva egyre nagyobb érdeklődés övezi ezt a csoportot. A legnagyobb figyelem a potenciálisan humán karcinogén N-nitrozodimetilaminra (NDMA) irányul, melyet klórozott ivóvizekből mutattak ki először Kanadában (Choi & Valentine 2002). A klóraminnal kezelt vizekben magasabb koncentrációban van jelen, illetve a klasszikus klórozás során is nagy affinitással jön létre akkor, ha jelen vannak a DOM-ban nitrogén prekursorok (Mitch et al. 2003). Mivel Kanadában és Amerikában foglalkoztak legkorábban ezekkel a vegyületekkel, és térképezték fel a potenciális kockázatot, így nem véletlen, hogy Kaliforniában 10 ng/literben, míg a kanadai Ontario Államban 9 ng/literben maximálták az NDMA mennyiségét, és mind az EPA előírásaiba, mind pedig a kanadai ivóvíz irányelvbe tervezik bevezetni a nitrózaminokra vonatkozó határértékeket, melyek szövetségi hatályúak lesznek (Richardson & Postigo 2011).

### *Haloamidok*

Elsősorban klórozás vagy klóramin alkalmazása után keletkeznek az ivóvízben. Az így kezelt vizekben 9,4 µg/l legmagasabb koncentrációban mutatták ki (Krasner et al. 2006, Richardson et al. 2008b). Valószínű, hogy számos, ebbe a csoportba tartozó vegyület a halonitrilek hidrolízisének következtében alakul ki, melyek szintén megtalálhatóak az ivóvízben. Jellemzőikkel a következő alfejezet foglalkozik részletesebben. A jodo-amid, a többi haloamidhoz hasonlóan, erősen citotoxikus és genotoxikus hatású. Az egész vegyületcsoportra jellemző, hogy az eddig vizsgált DBP csoportok közül a legcitotoxikusabbak, valamint a genotoxicitásukat tekintve is második helyen állnak a halonitrilek után (Plewa et al. 2008).

### *Halonitrilek*

Ezek a vegyületek klórral, klór-dioxiddal, klóraminnal vagy ózonnal történő vízkezelés következtében jöhetnek létre, ám legnagyobb koncentrációban azon vízművekből kerülnek ki, ahol



klóraminos technológiát alkalmaznak. A vegyületcsoport összkoncentrációja a fogyasztásra szánt ivóvízben elérheti a 14 µg/litert. Ha a nyersvíz forrás magasabb bromid-tartalommal rendelkezik, magasabb lesz a brominált haloacetonitrilek aránya (Richardson et al. 2003).

Az eddig tanulmányozott DBP-k közül a leggenotoxikusabbak (emlős sejteken vizsgálva), citotoxicitásukat tekintve a harmadik helyen állnak, a halonitrometánokhoz hasonlóan (Plewa et al. 2008).

#### *Halofuranonok*

A csoport legismertebb vegyülete a 3-kloro-4-(diklorometil)-5-hidroxi-2(5H)-furanon (MX), melyet korábban papírgyárak elfolyó vizéből azonosítottak, klórozott ivóvízből csak később mutatták ki, a világ minden tájáról származó vízmintákból. Ezek után a szintén klórozott ivóvízből kimutatták az MX több analógját, ideértve a geometriai izomerét (EMX), valamint az oxidált (ox-MX) és redukált (red-MX) formáját, továbbá brominált analógjait (BMX-ek). Az MX mutagén hatását *Salmonella* törzsekkel végzett Ames-teszttel kimutatták, és azt találták, hogy az ivóvíz összes mutagenitásáért 50-70%-ban az MX felelős (Kronberg et al. 1998). 1997-ben kimutatták karcinogenitását patkánykísérletekben (Komulainen et al. 1997).

#### *Haloaldehidek*

A haloaldehidek elsősorban klórozás és klóraminos fertőtlenítés következtében képződnek, de az ózonnal történő előkezelés is növeli a mennyiségüket. A trikloro-acetaldehid a legáltalánosabban mért haloaldehid, melyről, a monokloro-acetaldehiddel együtt bebizonyosodott, hogy *in vitro* mutagén hatásúak (Richardson et al. 2007). Emellett a trikloro-acetaldehid, valamint a tribromo-acetaldehid genotoxikusnak bizonyult humán sejtvonalakon (Liviác et al. 2010). Plewa és munkatársai (2008) kutatásai szerint a csoport legtöbb tagja erősen citotoxikus és genotoxikus CHO sejtekre, mely napjainkban is a leggyakrabban alkalmazott emlős sejtípus ilyen jellegű vizsgálatokban. Vizsgálataik során a genotoxicitás vizsgálatára az egyszerűen kivitelezhető, népszerű módszert, a comet assay-t alkalmazták.

#### *Halopirolok*

2003-ban egy izraeli vízkezelő üzemben kimutatták a 2,3,5-tribromopirolt. Ez volt az első eset, hogy a vegyületcsoport egy tagját megtalálták az ivóvízben. Az üzemben a vízkezelés során előklórozást, klór-dioxidos klóros, illetve klóraminos kezelést alkalmaznak, magas brómtartalmú vízforráson. Ez volt tehát az első eset, hogy kimutatták a klór-dioxid DBP képző hatását magas bromid/jodid tartalmú vízben (Richardson et al 2003). A tribromopirok kialakulásának

vizsgálatakor huminsav és fulvosav frakciókat gyűjtöttek nyers vizekből, és azt találták, hogy a tribromopiról elsősorban a huminsav reakcióból képződik, szemben a THM, HAA és aldehid vegyületekkel, melyek főként a fulvosav frakcióból. Kizárólag klórral kezelt vizekből nem volt kimutatható a vegyület, így feltételezhető, hogy a klór-dioxid vagy klóramin és a klór kombinált alkalmazása, esetleg a klóraminos kezelés önmagában vezet a kialakulásához (Schulten & Schnitzer 1993).

#### *Halokinonok*

Az első, a halokinonok csoportjába tartozó DBP vegyületet 2010-ben írták le, ez a 2,6-dikloro-1,4-benzokinon volt. A QSTR (*quantitative structure- toxicity relationship* – kvantitatív szerkezet-toxicitás kapcsolat vizsgálat) analízis azt mutatta, hogy a halokinonok erősen toxikusak. E felfedezést követően újabb halokinonokat - a 2,6-dikloro-3-metil-1,4-benzokinont, a 2,3,6-trikloro-1,4-benzokinont, a 2,6-dibromo-1,4-benzokinont – is kimutattak az ivóvízből. Ez utóbbi kivételével az ivóvízben előforduló mennyiségüket is vizsgálták, mely igen tág határok – 0,5-165 ng/l – között mozog. Olyan ivóvizekből sikerült kimutatni, melyeket klór és klóramin, vagy klóramin és UV-fény kombinációjával kezelték (Zhao et al. 2010).

#### *Haloketonok*

A haloketonok olyan vizekben keletkeznek, melyeket klórral, klóraminnal, klór-dioxiddal, vagy ózon-klór, esetleg ózon-klóramin kombinációkkal kezelnek (Williams et al. 1997). Egy amerikai kutatásban két haloketont, az 1,1-dikloropropanon és az 1,1,1-trikloropropanon mennyiségét mérték, és 10 µg/l, valamint 17 µg/l mennyiségben találták meg azokat (McGuire et al. 2002). Egy átfogó, szintén amerikai államközi vizsgálatban számos haloketont vizsgáltak (például az 1,1-dibromopropanont, az 1-bromo-1,1-dikloropropanont, az 1,1,3,3-tetrabromopropanont) különböző kezelések alá vetett ivóvizekben. Minden vegyület esetében µg/l nagyságrend alatti koncentrációkat mértek (Krasner et al. 2006, Weinberg et al. 2002). Egyes források potenciális karcinogén hatású anyagként említik ezeket (Woo et al. 2002).

#### *Klorát és jodát*

A klorátok klór-dioxiddal, illetve hipoklorittal kezelt ivóvizekben fordulnak elő nagyobb mennyiségben. Koncentrációjuk a klórszármazékokkal kezelt vizekben általában magasabb, mint a többi víztisztítási mellékterméké, beleértve a THM vegyületeket is. A US EPA által végzett adatgyűjtésből az derül ki, hogy a klór-dioxidot használó üzemekben a klorát-koncentráció átlagosan 120 µg/liter. Izraelben működő üzemek esetén ez az érték 52 µg/l, míg Virginia államban

14 µg/l, a kanadai Quebec városában 190 µg/l (Richardson et al. 2003, Baribeau et al. 2002, Hoehn et al. 2003). A klorát mutagénnek bizonyult *Salmonella* esetében, illetve kromoszóma aberrációkat okozott emlős sejtekben (Kurokawa et al. 1986b), illetve tiroid tumorokat okozott laboratóriumi egerek és patkányok esetén (US NTP 2005). A jodát klórozás és ózonnal történő kezelés során is kialakulhat, főként, ha a nyersvíz forrás jodid-tartalma magasabb. A brómmal ellentétben a jodát nem jelent veszélyt toxikológiai szempontból, hiszen az jodiddá redukálódik a szervezetben (Bichsel & Von Gunten 1999, 2000).

### *Aldehydekek és ketonok*

Számos nem halogénezett aldehidről találunk adatokat az USA nyilvántartási rendszerében, ide sorolható például a formaldehid, az acetaldehid, a glioxál, valamint a metil-glioxál is. Ezek az aldehidek főként ózonos vízkezelés során keletkeznek, ám klóros vagy klórdioxidos kezelés hatására ppb-s nagyságrendben kialakulhat a formaldehid. Az amerikai adatokból az derül ki, hogy ezek az aldehidek nagyobb mennyiségben keletkeznek azon vízkezelő üzemekben, ahol az ózonos kezelést alkalmazzák (több, mint 30,6 µg/l), nem pedig a klórdioxidost. Az ózont használó üzemek több, mint felénél átlagosan 5,3 µg/l mennyiségben mutatták ki a formaldehidet. Az acetaldehid, a glioxál és a metil-glioxál esetében ez a mennyiség az 11, 16 és 6 µg/l ezen kezelés után, míg a klór alkalmazása esetén a kimutatási küszöbérték (5 µg/l) alatt volt (McGuire et al. 2002).

### **3.3.3. Szennyezőkből kialakult melléktermék vegyületek**

Az eddig ismertetett melléktermék vegyületek többnyire a fertőtlenítőszeres és a nyersvizekben található szerves alkotórészek reakciójából jönnek létre. Ezek a vízforrások azonban számtalanszor ki vannak téve kommunális, illetve ipari szennyezéseknek (Kolpin et al. 2002). Ilyenek lehetnek a gyógyszerek, peszticidek, higiéniai termékek, hormonkészítmények, biszfenol A, alkilfenolok vagy akár algák toxinjai. Mivel ezen szennyezők, a természetes vizek szerves alkotórészeihez hasonlóan, képesek reagálni a vízfertőtlenítő szerekkel, így ezekből is kialakulhatnak melléktermék vegyületek. Az így kialakuló vegyületek az anyamolekulák gyakran aromás szerkezete miatt különösen veszélyesek lehetnek. A legtöbb ilyen anyagot kontrollált laboratóriumi vizsgálatokban állították elő, nem pedig az ivóvízből mutatták ki, ám esetleges kialakulásuk a természetes vizekben potenciális veszélyt rejt (Richardson & Postigo 2011).

### *Gyógyszer hatóanyagokból képződő melléktermék vegyületek*

A különböző betegségek megelőzésére, kezelésére és az életminőség javítására számtalan gyógyszer áll a fogyasztók rendelkezésére. Hatóanyagaik a helytelen hulladékkezelés, vagy éppen

a szennyvízbe való bekerülés útján bejuthatnak a természetes vizekbe, ezzel elszennyezve az ivóvízbázis alapját jelentő nyersvíz forrásokat. Mivel kémiaiag nagyon sokszínűek a gyógyszer hatóanyagok, ezért a vízfertőtlenítő szerekkel történő reakciójuk számtalan melléktermék vegyület kialakulásához vezethet.

Az egyik nagy hatóanyagcsoport az antibiotikumok, melyek közül többről kimutatták már, hogy klór-dioxidhoz és a szabad klórhoz hasonló oxidáló szerekkel reakcióba lépnek. Ilyenek például a tetraciklinek, flurokinolonok és a  $\beta$ -laktámok. Ezen antibiotikumok esetén a klórvegyületekkel való érintkezés után többnyire klórozott és OH-szubsztituált melléktermék vegyületek keletkeznek (Wang et al. 2011, Dodd et al. 2005). A flurokinolonok esetén más a helyzet, a kinolon gyűrűjük a klór-dioxidos kezelés után többnyire intakt marad. Ugyanez a kezelés a tetraciklinek antibiotikus aktivitását csökkenti a gyűrűs szerkezet hasítása révén. Szintén ennek a fertőtlenítő szernek a hatására a  $\beta$ -laktámokból, mint a penicillinből, amoxicillinből és a cefadroxilból hidrokinon, illetve szubsztituált fenolok képződnek (Wang et al. 2010, 2011, Navalon et al. 2008). Benner és munkatársai (2009a, 2009b) metoprolol és propranolol oxidációs termékeit vizsgálták vizes oldatokban. Azt kapták, hogy a propranolol esetében az ózonnal történő kezelés hatására egy felnyílt gyűrűt, valamint két aldehid-csoportot tartalmazó termék alakul ki az ózon naftalén-gyűrűre gyakorolt hatásának következtében. Az aldehidcsoportok kialakulása a metoprolol esetében is az ózonos kezeléshez köthető.

Világszerte az egyik legnagyobb mennyiségben előállított és fogyasztott gyógyszer hatóanyag a fájdalom- és lázcsillapító hatású ibuprofén (2-(4-izobutilfenil)-propionsav). Számos vény nélkül kapható készítményben megtalálható, a fogyasztók így nagyon könnyen hozzá juthatnak. A felszíni vizekben található mennyiséget a világ számos országában vizsgálták már, és általánosságban elmondható, hogy Amerika északi részén, illetve Európában is  $\mu\text{g/l}$ -es koncentrációban található meg, mind édes, mind pedig sós vizekben. A norvég partoknál 0,1-20  $\mu\text{g/l}$  koncentrációkat mértek, ami igazán aggasztó ezzel a hatóanyaggal kapcsolatban, hogy a szennyvíztisztítók elfolyó vizében is  $\mu\text{g/l}$  nagyságrendben található meg bomlástermékeivel együtt (Fent et al. 2006). Az ibuprofén számos bomlásterméke közül az egyik a dolgozatomban vizsgált anyag, 4-etilbenzaldehyd, mely az anyamolekulából hőközlés vagy oxidatív kezelés hatására keletkezik. A legvalószínűbb, hogy erre vezethető vissza az EBA ivóvízben való jelenléte.

### *Ösztrogénekből képződő melléktermék vegyületek*

Az ösztrogének napjainkban egyre nagyobb problémát okoznak a környezetben, illetve a humán populáció körében is. A hormonális fogamzásgátlók és állatgyógyászati készítmények egyaránt bejutnak a szennyvizekbe, vagy közvetlenül a talajvízbe, így elszennyezve azt. Ezek a vegyületek önmagukban is komoly problémákat képesek okozni, ám több vizsgálat kimutatta,

hogy a vízkezelés során hozzájárulnak a DBP vegyületek számának emelkedéséhez. A klórral történő kezelés után a diklórozott származékok ösztrogén hatása sokkal kisebb, mint a monoklórozottaké (Pereira et al. 2011).

#### *Peszticidekből képződő melléktermék vegyületek*

Az elmúlt évtizedekben a növénytermesztés intenzifikációja miatt rengeteg peszticid került ki a környezetünkbe. A kijuttatás során vagy a növények lombzatáról bemosódva könnyen bekerülnek a talajba. Ha az UV-sugárzás hatására nem bomlanak le, vagy talajszemcsék felszínén nem kötődnek meg, egyenesen a talajvízbe kerülnek. Mivel számtalan vegyületcsoportba sorolhatók ezek a szerek, így a bomlásuk, valamint a vízkezelés során lejátszódó kémiai reakciók miatt is tovább növelik a DBP-k számát az ivóvízben.

Vannak olyan esetek, amikor a klórvegyületekkel történő vízkezelés után kialakuló termékek toxikusabbak az anyamolekuláknál. Brix és munkatársai (2009) a tirazin bomlástermékeiről, míg Duirk és Collette (2006) a klórpírifosz bomlástermékéről, a klórpírifosz-oxonról állapították meg ugyanezt.

Az organofoszfátok ózonos kezelés hatására oxon intermedier vegyületek (diazooxon, metil-paraoxon, metil-paration és paration) keletkeznek, melyek a víz pH-jának függvényében képesek felhalmozódni (Wu et al. 2009).

#### *Kozmetikumok összetevőiből képződő melléktermékek*

A kozmetikumok csomagolásán számtalan összetevővel találkozhatunk. Ezek a vegyületek a tisztálkodás során bekerülnek a szennyvízbe, vagy természetes vizekben történő fürdőzés során közvetlenül a nyersvíz forrásokba.

A legtöbb ilyen termékben megtalálhatók a parabének, melyeket a kozmetikai, a gyógyszer- és az élelmiszeripar is használ tartósítószerként baktericid és fungicid hatásaik miatt. Mind a klórvegyületekkel, mind pedig az ózonnal történő kezelés hatására számos melléktermék vegyület alakulhat ki belőlük. Előbbi hatására klórozott parabén származékok keletkeznek, míg utóbbi hatására hidroxiláción esik át a molekulák aromás gyűrűje és/vagy észter lánca (Terasaki & Makino 2008, Tay et al. 2010).

A nyersvíz forrásokba legkönnyebben talán az UV-védelmet biztosító készítmények hatóanyagai kerülhetnek be. Ebbe a csoportba sorolhatjuk az oktil-p-metoxicinnamátot, valamint az oktil-dimetil-p-aminobenzoátot, melyek a klórral való reakció után a folyamat végén kisebb észterekké alakulnak. Néhány, az oktil-p-metoxicinnamátból kialakult DBP enyhén mutagénnek bizonyult (Nakajima et al. 2009).

Jelen disszertáció szempontjából a legérdekesebb kozmetikai adalékanyag csoport a terpenoidok. Joll és munkatársai (2010) a természetes vizek klórozását modellezték  $\beta$ -karotin jelenlétében. A keletkező melléktermék vegyületeket CLSA/GC-MS (*closed loop stripping analysis/ gas chromatography- mass spectroscopy- zártrendszerű illatanyag gyűjtés/gázkromatográfiás elválasztással kombinált tömegspektrometria*) módszerrel vizsgálták. Számos trihalometán vegyületet mutattak ki a metil-ke-ton csoportok haloform reakcióinak köszönhetően.

Bár a fent említett tanulmányban nem esik szó a 4-etilbenzaldehidről, ám Kanasawud & Crouzet (1990) tanulmányában egy modellkísérletben a  $\beta$ -karotin bomlástermékeként nevezik meg a vegyületet. Kísérletükben a hő és az oxidáció hatását vizsgálták a  $\beta$ -karotin bomlására. Számos illékony és nem illékony vegyületet írtak le. A  $\beta$ -karotin oldatot 3 órán át tartották 97°C-on, különböző oxigén koncentrációkon. Azt találták, hogy minél nagyobb az oldott oxigén mennyisége, annál több bomlástermék keletkezik, főként az illékony frakcióban, ahová a 4-EBA is sorolható. Feltételezhető tehát, hogy a kozmetikumokból, növényi részekből a nyers vizekbe kerülő karotinból oxigéndús környezetben, emelkedő hőmérséklet mellett kialakulhat a jelen disszertációban vizsgált vegyület, a 4-etilbenzaldehyd.

### 3.4. A víztisztítási melléktermék vegyületek humán egészségügyi vonatkozásai

A fentiek alapján jól látható, hogy egészségünket számtalan, az ivóvízben is megtalálható anyag veszélyezteti. A DBP vegyületekkel nem csupán ivás vagy étkezés útján kerülhetünk kapcsolatba. Az illékony DBP-k a levegőbe kerülnek, így a napi tisztálkodás vagy klórozott vízű medence használatakor is a szervezetünkbe juthatnak, egyes anyagok pedig akár a bőrön keresztül is felszívódhatnak. A medencék vize a benne található egyéb szerves szennyeződések miatt (verejték, vizelet, bőrsejtek, naptejek és egyéb testápolási cikkek) több DBP-t tartalmaznak, mint az azokat tápláló vízforrások. Néhány vegyületet, kiváltképp a triklóramint összefüggésbe hozzák az asztma kialakulásával (Richardson & Postigo 2011).

Napjainkban rengeteg ember szenved daganatos megbetegedésekben. Ezen betegségek többségének kóroktana igen összetett, ám kialakulásukban egyértelműen szerepet játszanak környezeti tényezők. Az ivóvízben található karcinogének témakörével az 1970-es években kezdtek el foglalkozni, ugyanis megfigyelték, hogy azon lakosok körében, akik a Mississippifolyóból származó kezelt ivóvizet fogyasztanak, gyakoribbak a daganatos megbetegedések, mint a felszín alatti vízforrásokat fogyasztók körében (Harris et al. 1974). Ugyanebben az évben jelent meg Marx (1974) tanulmánya a Science folyóiratban, melyben először jelenti ki, hogy „az ivóvíz rákot okozhat”. Ettől kezdve a kutatók fokozott figyelmet fordítottak a témakör vizsgálatára, hiszen korábban az ivóvíz biztonságán a megfelelő mikrobiológiai állapotot értették. A már

korábban említett holland kémikus, Rook munkássága sokat változtatott ezen. Megfigyelései alapján ugyanis a klórral kezelt ivóvízben megnő a kloroform mennyisége a nyers vizekhez képest. Ez az információ felkeltette az NCI (*National Cancer Institute*- Az USA Nemzeti Rákkutató Intézete) érdeklődését, és igaz, hogy a környezeti koncentrációnál jóval magasabb dózisokban, de sikerült bizonyítaniuk egereken és patkányokon a kloroform rákkeltő hatását *per os* adagolás mellett (NCI, 1976), ennek hatására a kloroformot kivonták például a kozmetikai szerekből.

A világon először Kanadában szabályozták a DBP vegyületek határértékét 1978-ban, ekkor 4 trihalometán-vegyületet vontak szabályozás alá, köztük a kloroformot. Az 1980-as évektől napjainkig számos vegyületcsoportot azonosítottak, mint DBP. A halofuránokról, nitrózaminokról és halogénezett furánokról hamar kiderült, hogy potenciális karcinogének. A DBP-eket, különös tekintettel a klórozás hatására kialakultakat, összefüggésbe hozzák daganatos megbetegedésekkel, ám az epidemiológiai kutatások eredményei a húgyhólyagrak esetében tekinthetők kellően alátámasztottnak (Hrudey 2009).

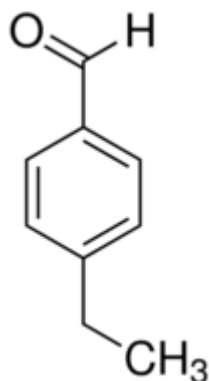
A DBP-k reprodukív kockázatával kapcsolatban 1998-ban egy, Waller és munkatársai által Kaliforniában végzett kohorszvizsgálat (csoportos, nyomonkövetéses vizsgálat) eredményeinek megjelenéséig igen sok szerző közölt nem szignifikáns és sokszor következtelen eredményeket a születéssel kapcsolatos rendellenességek és a klórozás során képződő melléktermékek között. Waller munkacsoportjának eredményei a nagyszámú adat és az erős összefüggések miatt ráirányították a tudományos közélet figyelmét a spontán vetélések és a THM kapcsolatára (Waller et al 1998). A későbbi tanulmányokban vizsgált csoportok közötti különbségek csak gyenge szignifikanciát mutattak (Chisholm et al. 2008, Hwang et al. 2008).

Bizonyos DBP csoportok mutagénnek bizonyultak, illetve a DNS károsodását okozzák vagy kovalens kötések kialakításával, vagy pedig a DNS szál töredezettségének előidézésevel (Bull et al. 1995, Catto et al. 2013). Számos, szabályozás alá eső, tehát egészségügyi határértékkel rendelkező THM vegyületről bebizonyították már, hogy laboratóriumi állatokon végzett kísérletek alapján DNS károsító hatásúak, ennek következtében karcinogén hatásúak lehetnek. Továbbá a bróm-tartalmú vegyületek citotoxikusak (Landi et al. 1999). A HAA (haloecetsav)-vegyületcsoportba tartozó anyagok közül is számos mutagénnek és citotoxikusnak bizonyult, ezen vegyületek esetén a brómozott származékok szintén toxikusabbak a klórozott származékoknál (Richardson et al. 2007).

Mivel a melléktermék vegyületek kémiaiailag nagyon változatosak, így sokféleképpen hathatnak az élő szervezetekre. Évről évre egyre több DBP-t fedeznek fel, melyeknek még nem ismertek a toxikológiai jellemzői, így fennáll annak a veszélye, hogy a még nem szabályozott, határértékkel nem rendelkező vegyületek nagyobb veszélyt jelentenek az egészségre, mint azok, melyek rendelkeznek határértékkel, és számos toxikológiai jellemzőjüket ismerjük.

### 3.4.1. A 4-etilbenzaldehyd jellemzése, toxikológiai vonatkozásai

A 4-etilbenzaldehyd (2. ábra) kémiaiilag az aromás aldehydek csoportjába sorolható, a benzaldehyd származékának tekinthető. Ahogy az előző fejezetben szerepelt, két anyamolekula, a  $\beta$ -karotin, valamint a 2-(4-izobutilfenil)-propionsav, azaz az ibuprofén bomlásából is kialakulhat az ivóvízben.



2. ábra A 4-etilbenzaldehyd szerkezeti képlete

Az anyag toxikológiai jellemzőiről nagyon keveset tudunk. A termék biztonsági adatlapján (CAS 4745-78-1) a sűrűségén, lobbanáspontján, forráspontján, halmazállapotán és színén kívül semmilyen egyéb információ nem szerepel. Nem csupán a laboratóriumi reagensek termékcsoportjában, hanem az íz- és illatanyagok csoportjában is megtalálható az egyik forgalmazó, a Sigma-Aldrich honlapján (<http4>).

A vegyület toxikológiájával kapcsolatban eddig rendkívül kevés publikáció jelent meg. Gerinces modellszervezeten eddig kizárólag zebradánió, kizárólag hazai tudományos műhelyekből kerültek ki a tanulmányok. Rácz és munkatársai (2012) kifejtett, AB vonalból származó zebradánió egyedeken vizsgálták a vegyület hatásait. Az előzetes információk teljes hiánya miatt meghatározták az  $LC_{50}$  értéket az OECD 203-as irányelv szerint, mely 23,49 mg/l-nek adódott. Ezek után három hónapos szubakut kezelés alá vetették a halakat, félstatikus rendszerben, alacsony koncentrációk alkalmazásával ( $LC_{10}$  érték alatt), majd szövettani mintákat vettek és ezeket értékelték PANNORAMIC rendszerrel. A hisztopatológiai vizsgálatok azt mutatták, hogy a májban, vesében és a bőrön a harmadik kezelési héten jelentkeztek elváltozások. A nagyobb kezelési koncentrációk esetén (10 és 5 mg/l) fokozatosan nőtt az elváltozások mértéke, míg a második hónap végén el nem érte a maximális mértéket. Az alacsonyabb koncentrációk (2,5 és 5 mg/l) nem volt megfigyelhető számottevő elzsírosodás a máj parenchymában, míg magas koncentráció esetén az elváltozás mértéke szignifikánsan növekedett. A halak epidermiszében található mucin-termelő sejtek száma az idő előrehaladtával emelkedett. A vese disztális és proximális tubulusainak epitel sejtjeiben is jelentkeztek szemmel látható elváltozások. Minden



kezelt csoportban a halak letargikusak voltak és nem mutattak menekülési viselkedést, viszont az állatok egyensúlyában és függőleges mozgásában nem voltak abnormalitások.

A vegyülettel kapcsolatos toxikológiai információkhoz hasonlóan az ivóvízben megtalálható mennyiségéről is rendkívül kevés információ van. Li és munkatársai (2017) kínai ivóvíz kezelő üzemekből elfolyó, frissen kezelt, illetve az üzemek 30 km-es körzetéből származó, fogyasztóhelyeken vett mintákat vizsgáltak. Mintavételi pontonként 2 liter vizet szűrtek át speciális szűrőkön, majd végeztek analitikai elemzést. A 4-etilbenzaldehydet minden mintában megtalálták, koncentrációja 29,3 és 60,6 ng/l között változott, az átlagos koncentráció így 44,5 ng/l-nek adódott (SD=6,60 ng/l). Jelenleg más földrésről származó adatok nem állnak rendelkezésre az anyag környezeti koncentrációival kapcsolatban.

### **3.5. A 4-EBA, mint élelmiszeripari adalékanyag**

#### **3.5.1. A benzaldehyd, mint aromaanyag toxikológiai vonatkozásai**

A modern élelmiszeripar széles körben alkalmaz íz-és illatanyagokat. Ezek közül számos anyag természetes eredetű, ám rengeteg szintetikus előállított. Sok vegyületről már bebizonyosodott, hogy toxikusak, ám az ipar továbbra is használja ezeket, vagy sokáig használta azokat betiltásukig. Például különböző édesítőszeres és mesterséges színezékek (Sujbert et al. 1993, Weihrauch & Diehl 2004, Huff & LaDou 2007, Amchova et al. 2015), mint adalékanyagok fontos szerepet játszanak a modern élelmiszer-feldolgozásban. Egy átlagos fogyasztó minden nap találkozik ezekkel az anyagokkal, ezért kiemelten fontos, hogy tisztában legyünk ezen anyagok humán-egészségügyi veszélyeivel.

Az élelmiszeripar régóta használ aldehideket. Talán a legismertebb mindközül a benzaldehyd, mely mesterséges mandula olajként is ismert. Ezen fejezetben azért foglalkozom ezzel az anyaggal, mert mind szerkezetében, mind fiziko-kémiai tulajdonságaiban, valamint jellegzetes mandula illatában is hasonlít a 4-etilbenzaldehydhez. A mesterséges vanília aroma után a legáltalánosabban használt aromaanyag (Krings & Berger 1998). A benzaldehydnek széleskörű, átfogó toxikológiai irodalma van (Andersen 2006), valamint kémiai biztonsági adatlapja is számos hasznos információt tartalmaz (CAS 100-52-7). Az akut vizsgálatok eredményei kétségtelenül fontosak, ám a fogyasztók, az EBA-hoz hasonlóan, minden nap érintkezhetnek ezzel az anyaggal, így nagy hangsúlyt kell fektetni a szubakut és krónikus hatások vizsgálatára. A biztonsági adatlapja szerint a benzaldehyd kevésbé toxikus az emlősökre nézve (nyúl, patkány, egér, tengerimalac), az orális LD<sub>50</sub> értékek igen magasak (magasabbak, mint 1000 mg/ttkg), az egér esetében ez az adat 28 mg/ttkg, ám ez sem számít kifejezetten toxikusnak a tesztszervezetre nézve. Csirke embriókon végzett vizsgálatok kimutatták a benzaldehyd teratogén hatását, hiszen a csontváz és a végtagok koncentrációfüggő elváltozásait mutatták ki már a korainak mondható, 1980-as években végzett

vizsgálataiban is (Abramovici & Rachmuth-Roizman 1983). A WHO (1996) jelentése szerint a benzaldehid késlelteti az embriók fejlődését, valamint csökkenti a magzati, illetve újszülöttkori testtömeget egerek, hörcsögök, illetve nyulak esetében, de kizárólag azokban a koncentrációkban, melyek a szülőkre nézve is toxikusak. A WHO későbbi, 2002-es állásfoglalása szerint a benzaldehid elfogadható napi bevétele (ADI- *acceptable daily intake*) 5 mg/ttkg, a becsült napi bevétel Európában 9300 µg/fő/nap, míg az Amerikai Egyesült Államokban 36 000 µg/fő/nap (WHO, 2002).

### 3.5.2. A 4-etilbenzaldehyd élelmiszertoxikológiai vonatkozásai

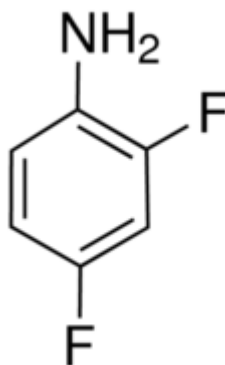
Az EBA, a benzaldehidhez hasonlóan színtelen, mandula illatú folyadék. Analitikai módszerekkel már számos élelmiszerből kimutatták, mint illatanyagot. Növényi eredetű élelmiszerek közül például megtalálható a salátában és a káposztában (Lonchamp et al. 2009), zöldbabban (Barra et al. 2007), valamint zöld teában (Shimoda et al. 1995). Állati eredetű élelmiszerekben is megtalálható, mint illatkomponens, például érlelt szardellában (Triqui & Reineccius 1995), kagylófélékben (Le Guen et al. 2000) és különféle tengeri halakban (Morita et al. 2003, Silva et al. 2012).

A benzaldehidtől eltérően, az EBA biztonsági adatlapja (CAS 4745-78-1) nem tartalmaz információkat az anyag kémiai vagy toxikológiai kockázatairól, ezért is olyan fontos minél több információ begyűjtése, hiszen az emberek különböző módokon érintkezhetnek vele, kerülhet be a szervezetükbe.

A WHO (2002) 1800 µg/nap mennyiségben határozta meg az EBA-val egy szerkezeti csoportba tartozó vegyületek (aldehidek) beviteli határértékét. Továbbá véleményük szerint nem hordoznak biztonsági kockázatot abban a mennyiségben, melyben íz- és aromaanyagként bekerülhetnek a fogyasztók szervezetébe. A „1272/2008 EK rendelet (2008. december 16.) az anyagok és keverékek osztályozásáról, címkézéséről és csomagolásáról, a 67/548/EGK és az 1999/45/EK irányelv módosításáról és hatályon kívül helyezéséről, valamint az 1907/2006/EK rendelet módosításáról” nem sorolja a veszélyes anyagok közé. Az EBA immáron önállóan megtalálható az EFSA (*European Food Safety Authority*- Európai Élelmiszerbiztonsági Hatóság) 2012-ben megjelent, az ízesítő anyagokról készült tudományos véleményében, ám nem fogalmaztak meg biztonsági aggályokat az anyaggal kapcsolatban. Azért meglepő mindez, mert ebben a dokumentumban mindössze egy, az EBA toxicitásával kapcsolatos, ám meg sem jelent („*unpublished*”) publikációt említenek. Az EFSA az anyag MSDI (*maximized survey-derived intake* – maximális számított beviteli érték) értékét 0,37 µg/fő/nap-ban határozta meg (EFSA, 2012). A vegyület a nagy vegyszerforgalmazó vállalatok termékpalettáján is megtalálható. Kezdetben, mint kémiailag szintetizált vegyületet és analitikai standard anyagot lehetett

megvásárolni, ám néhány éve az „Íz- és illatanyagok” kategóriában is megtalálható, kóser minősítéssel is. Az anyag 2019 februárja óta rendelkezik REACH (*Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals* - vegyi anyagok regisztrációja, értékelése, engedélyezése és korlátozása) regisztrációval, mint ipari intermedier, kémiai biztonsági adatlapja néhány egyszerű fiziko-kémiai jellemző kivételével semmilyen információt nem tartalmaz. Mindezeket összegezve, bár néhány növényi és állati táplálékforrás illatkomponenseként természetes módon is érintkezünk vele, az anyagban rejlő veszélyt az ivóvízben bizonyított jelenlétén kívül az élelmiszeripari felhasználás jelenti.

### 3.6. A 2-4-difluoroanilin jellemzése, toxikológiai vonatkozásai



3. ábra A 2,4-difluoroanilin szerkezeti képlete

A halogénezett anilin származékokat, így a 2,4-difluoroanilint (DFA), vagy 1-amino-2,4-difluorobenzént (3. ábra) az iparban intermedierként használják festékek, gyógyszerek és növényvédőszer gyártásakor. Az akut expozíció legtöbbet vizsgált következménye a methemoglobinémia (Eadsforth et al. 1984; Harrison & Jollow 1987), valamint a nefrotoxicitás, ami a vegyület bomlásakor képződő aminofenoloknak köszönhető (Lo et al. 1990, 1991; Rankin et al. 1986). A 2-4-difluoroanilin a vérbe jutást követő metabolikus aktivációja után met-hemoglobin és nitrozoarén keletkezik. Ez utóbbi reagál a  $\beta$ -59 ciszteinnel, és szulfinsav-amid keletkezik, mely a hemoglobinhoz kötődik. Boogaard és munkatársai (1994) ennek a terméknek a mérésére dolgoztak ki egy jól használható módszert. Vizsgálataikhoz olyan vegyi üzemben dolgozó munkások vérmintáit használták, akik biztosan érintkeztek az anyaggal, illetve egy DFA-t gyártó üzem bontásánál dolgozó munkásokét. Állatkísérleteiket SPF Fischer 344 patkányokon végezték, a DFA-t gyomorszondán juttatták az állatok szervezetébe 0, 0.078, 0.775, 7.75 és 77.5 pmol DFA/testtömeg kg/nap dózisban. Mind az emberek, mind a patkányok esetén alkalmasnak találták a fent említett, hemoglobinhoz kötött DFA addukt mennyiségének mérését a DFA-nak

való kitétség kimutatására. Korábban csak a methemoglobin mennyiségének mérését használták, ám ez csak a DFA-nak való 24 órán belüli kitétség kimutatására alkalmas, míg a Boogaard és munkatársai által kidolgozott módszerrel a vörösvértestek életideje határolja be a kimutathatóság idejét, ez emberek esetén 126, míg patkányok esetén 65 nap.

Halmodellen a 4-EBA-hoz hasonlóan Rácz és munkatársai (2012) vizsgálták a DFA hatásait szubakut kezelést alkalmazva. Első lépésként ez esetben is meghatározták az akut LC<sub>50</sub> értéket kifejlett állatokon, az OECD 203-as számú irányelv alapján. Ez az érték 29,36 mg/l-nek adódott, ami valamivel magasabb, mint az EBA esetében. Az irodalomban találunk egy ellentmondásos eredményt. Mosneang és munkatársai tanulmánya 2014-ben jelent meg a *The Thai veterinary medicine* című folyóiratban. Vizsgálataikat Rácz és munkatársaihoz hasonlóan az OECD TG 203 alapján végezték, ám meglepő, hogy az általuk kapott LC<sub>50</sub> érték 200,96 mg/l, tehát közel százszorosa a magyar szerzők eredményeinek. A Szerzők nem is próbálják megmagyarázni a nagyságrendi különbséget az azonos módszerrel végzett vizsgálatok között.

A magyar tanulmányban a korábban már az EBA esetén leírt vizsgálatokat végezték. A halak viselkedése letargikus volt, úszás közben sűrűn és gyorsan változtattak irányt. Az EBA-hoz hasonlóan a DFA esetén is a kísérlet kezdetétől számított harmadik héten jelentkeztek a hisztopatológiai elváltozások, melyek a második hónapban érték el maximumukat. A DFA hatására diffúz zsíros elváltozások, illetve apró zsírcseppek is kialakultak a kísérleti állatok májában, valamint a máj parenchyma sejtjeiben megnőtt a glikogéntartalom a kontroll csoportéhoz képest. Az EBA esetében tapasztaltakhoz hasonlóan a vese disztális és proximális tubulusainak epitel sejtjeiben is jelentkeztek szemmel látható elváltozások. A halak epidermiszében található mucin-termelő sejtek száma az idő előrehaladtával ebben az esetben is emelkedett.

### 3.7. Halmodellek a toxikológiában

Az élő szervezetekre és a környezetre gyakorolt specifikus hatások modellezése inkább *in vitro*, míg a szervezetre kifejtett komplex hatás, illetve az élő szervezetben végbemenő komplex folyamatok vizsgálata *in vivo* módszerekkel történik. A vizsgálat célja nagyban befolyásolja, hogy milyen modell szervezeteket alkalmaznak. A környezeti kockázatok becslésére inkább kételtű és hal modelleket alkalmaznak, míg az emberi szervezetre gyakorolt hatások vizsgálatánál elterjedtebbek az emlős modellek.

A REACH irányelvek mellett meg kell említeni az OECD 3R stratégiáját is, melynek fő célja a felhasznált kísérleti állatok számának csökkentése, azok helyettesítésével (akár *in vitro* módszerekkel) vagy a módszerek finomításával, fejlesztésével.

A halak, mint taxonómiai csoport alkotják az egyetlen kizárólag vízben élő gerinces csoportot, és ezért nélkülözhetetlen részét képezik az integrált toxikológiai vizsgálatoknak

(Spitsbergen & Kent 2003). Mivel a biokémiai, élettani és fejlődésbiológiai folyamatok genetikai háttere a gerinces élőlények körében nagymértékben konzervált (Bond 1979), ezért a hal modelleken kapott eredmények viszonylag jól extrapolálhatók emlősökre, így az emberre is. Itt főként az alapvető mechanizmusok feltérképezésére kell gondolni, hiszen az egyes anyagok toxicitása nem hogy rendszertani egységként, de halfajonként is nagyságrendi különbségeket mutathat.

A halmodellek alkalmazásának számos előnye van. A halembriók jól illeszkednek a 3R stratégiába, hiszen a halembriókat a táplálkozó kor eléréséig - ez a zebradánió esetében 120 hpf (*hours post fertilization*- az ikra termékenyülésétől eltelt órák száma)- a jelenleg hatályos szabályozás szerint (2010/63/EU) nem tekintendő kísérleti állatnak. Ugyanakkor az embriók már olyan komplex rendszerek, melyekben megfigyelhetőek az egyes fejlődési és differenciálódási folyamatok, a különböző szervek és szervrendszerek közti interakciók, ezért a rajtuk végzett vizsgálatok alternatívaként szolgálhatnak az emlős modellek helyettesítésében (Scholz et al. 2008).

A vizsgálatok gyorsan, és az emlős modellekhez képest olcsón kivitelezhetőek. A halak, mivel egész életciklusukat a vízben töltik, így teljes testfelületükkel érintkeznek a közeggel. Nem meglepő, hogy a halakon végzett toxikológiai vizsgálatok nagy részében egyszerűen az állatok életközegébe kerül a vizsgálandó anyag, a halak pedig meghatározott időt töltenek el abban. A szárazföldi gerinces tesztorganizmusokhoz hasonlóan a halak esetében is lehetőség van a takarmánnyal történő adagolásra, illetve az intraperitoneális térbe való bejuttatásra, ám ez utóbbi nem igazán elterjedt.

A vizsgálatokhoz használt halfajok köre igen széles. Vannak olyan halfajok, melyek gazdaságilag jelentősek, ám a toxikológia gyakorlatában is igen széles körben alkalmazzák, ilyen például a ponty (*Cyprinus carpio*), a harcsa (*Silurus glanis*), a szivárványos pisztráng (*Oncorhynchus mykiss*) vagy a süllő (Sander lucioperca). Vannak olyan halfajok, melyek az akvarisztika világából kerültek át a toxikológiába, ilyen a szivárványos guppi (*Poecilia reticulata*) és a világszerte kedvelt zebradánió (*Danio rerio*). Területi különbségek is megfigyelhetőek a halmodellek kiválasztásában. Japánban leggyakrabban a medakát (*Orizias latipes*), az Amerikai Egyesült Államokban a tűzcshellét (*fathead minnow- Pimephales promelas*), míg Európában elsősorban a zebradániót használják (Ankley & Johnson 2004).

### **3.7.1. A zebradánió, mint toxikológiai vizsgálatok modellállata**

A zebradánió őshazája Elő-India. Elterjedési területe igen széles. A hal háta olajbarna, az oldalak és a has alapszíne sárgásfehér. Törzsén a kopolyúfedőtől a farokúszó végéig több sötét acélkék sáv húzódik. A csíkozottság a farok alatti úszóra is kiterjed. A hátúszó alapszíne

sárgásbarna, kék szegéllyel, mely kívül fehéren szegélyezett. A kopoltyúfedő kék, fehér foltokkal tarkított. A nőstény sokkal teltebb, színei kevésbé élénkek. A hím karcsú, alapszíne aranysárga, csíkjai sötétebbek. Testhossza átlagosan 4,5 cm. (Horn & Zsilinszky 1983).

Laboratóriumi körülmények között is könnyen tartható, kis testű csapathalak, melyek a víz, illetve a táplálék minőségére kevésbé érzékenyek, helyigényük kicsi. 3-4 hónap alatt válnak ivaréretté, a nőstényektől akár hetente lehet viszonylag nagy mennyiségű ikrát nyerni. Az embriók fejlődése könnyen nyomon követhető az átlátszó ikrahéjon keresztül. Az embrióknak 24 óráskorukra az összes létfontosságú szervük kifejlődik, 72 órával a termékenyülés után kikelnek a lárvák, majd ezt követően 2-3 nap alatt elúsznak és megkezdik önálló táplálkozásukat.

Egyre nagyobb figyelmet kapnak a kémiai toxicitással, a gyógyszerfejlesztéssel és az emberi betegségekkel kapcsolatos kutatások. Különböző genetikai technikákkal kiegészítve lehetőség nyílik hatékony, széles körben alkalmazható 'screening' eljárások kifejlesztésére. Ahhoz, hogy meg tudjuk becsülni egy vegyi anyag toxicitását, szükséges megállapítani a különféle toxikológiai végpontokat és a dózis-válasz összefüggéseket, megmagyarázni a toxicitás mechanizmusait, valamint leírni a vegyi anyag toxikodinamikáját (Engeszer et al. 2007).

A zebradánió (*Danio rerio*) számos olyan tulajdonsággal rendelkezik, amely miatt kiemelkedik a többi modellként használt állatfaj közül. Rövid a generációs intervalluma, hetente nagy mennyiségű ivartermék nyerhető tőlük, az embriók fejlődése *ex utero* zajlik, és jól nyomon követhető az átlátszó ikrahéjon keresztül (Lieschke & Currie 2007). Széles körben használják fejlődésbiológiai és genetikai (Eisen 1996; Grunwald & Eisen 2002), gerontológiai (Gerhard & Cheng 2002), tumorbiológiai (Lieschke & Currie 2007), viselkedésbiológiai (Engeszer et al. 2007; Spence & Smith 2005), toxikológiai (Ankley & Johnson 2004; Hill et al. 2005, Rác et al. 2012) vizsgálatokban.

Egyre inkább a figyelem középpontjába kerülnek az embrió tesztek, mivel, ahogy már korábban szóba került, gyakran és nagy mennyiségű utód nyerhető a zebradánióktól, az átlátszó ikrahéjon keresztül a fejlődésük teljes folyamata megfigyelhető, és jól illeszkedik a 3R stratégiához. Kimmel és munkatársai (1995) pontosan leírták az embriófejlődés folyamatát, részletes ábrákkal. Így fejlődésbiológiai vizsgálatokban nyomon követhető, hogy a tesztelendő anyag hatással van-e a fejlődés sebességére, okoz-e szemmel látható elváltozásokat a fejlődő szervekben. Az embriókat leggyakrabban termékenyüléstől kezdve vizsgálják 96 hpf korukig, hiszen eddig az időpontig kifejlődnek az embriók főbb szervei. Vannak esetek, amikor célszerű egy bizonyos expozíciós időablakban vizsgálni az anyagok hatását. 96 óráskorára az embrió átesik a fejlődés legintenzívebb részén, kifejlődnek az emésztőrendszer részei, kinyílik az állat szája (Strähle et al. 2012), a hormonszintézis és a nukleáris receptorok ebben az időben kezdenek el kialakulni, ezért ebben az életszakaszban már a hormonális hatásokra is érzékenyebbek az embriók

(Fetter et al. 2015). Ennek köszönhetően ismeretlen hatású anyagok vizsgálatakor érdemes kiemelt figyelmet fordítani erre az életszakaszra.

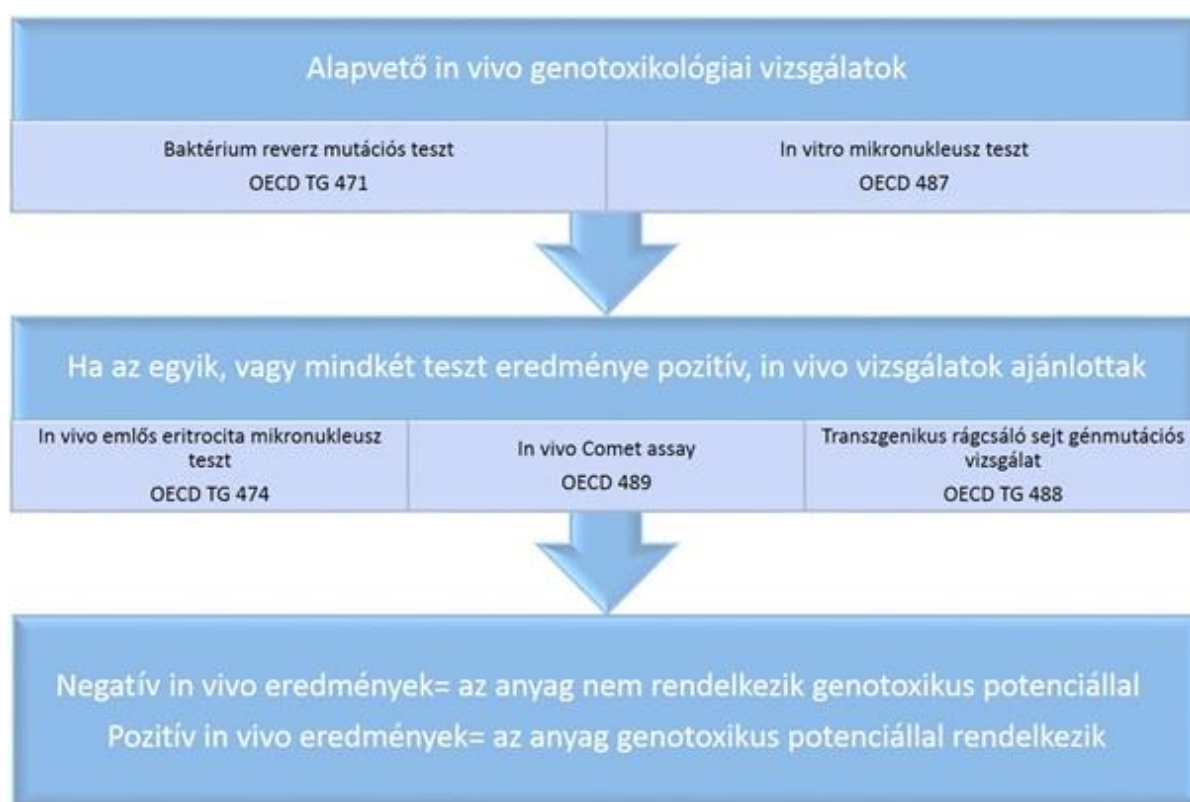
### **3.8. Genotoxikológiai vizsgálatok, különös tekintettel a halakon alkalmazható módszerekre**

A genotoxikológia a toxikológia azon ága, mely a különböző anyagok DNS-re gyakorolt károsító hatását vizsgálja. A genotoxikus anyagok olyan vegyületek, amelyek tartósan megváltoztatják a DNS-ben tárolt genetikai információt, így az örökölt tulajdonságok megváltozását idézhetik elő, valamint ide sorolhatók a javító mechanizmusokra ható, azokat gátló vegyületek is (Szilágyi 2003). A genotoxikus anyagok által az örökítőanyagban okozott változások három típusba sorolhatók. Az úgynevezett pontmutációk a DNS szekvencia egy nukleotidot érintő megváltozásai. Ezek során bázisok kicserélődnek, számuk megváltozik. Következő típus a kromoszómák strukturális megváltozása. Ennek során a kromoszómák törése révén átrendeződik a bennük tárolt genetikai információ, például deléció, inverzió vagy transzlokáció révén. A harmadik típus a kromoszómák számbeli változása (aneuploid, poliploid mutációk). A felsorolt változások szoros összefüggésben vannak a vegyületek karcinogén hatásával, hiszen az általuk indukált genetikai elváltozások lehetnek felelősek különböző rákos folyamatokért. A karcinogéneket két csoportra oszthatjuk: genotoxikus karcinogének a DNS-t közvetlenül károsítják (például alkilező szerek, nehézfémek, policiklusos aromás szénhidrogének), az epigenetikus karcinogének pedig közvetett úton idézik elő a DNS-ben az elváltozásokat, például immunszuppresszió révén hatnak (Mohanty et al. 2011). Nagyon fontos tehát a különböző anyagok genotoxikus hatásának vizsgálata.

A mikroorganizmusok kedvelt tesztorganizmusai a mutációs vizsgálatoknak, ezek közül a két leggyakrabban alkalmazott módszer a bakteriális reverz mutációs teszt, azaz az Ames-teszt (OECD TG 471), melyhez *Salmonella typhimurium* és *Escherichia coli* törzseket is alkalmazhatnak. Egyszerű és népszerű módszer a *Saccharomyces cerevisiae* génmutációs vizsgálat (OECD TG 480).

Emlős tesztszervezetből származó mintákra is számos OECD irányelv áll rendelkezésre. Az *in vitro* génmutáció vizsgálat emlős sejteken (OECD TG 476) használható a kémiai anyagok által előidézett génmutációk vizsgálatára, a lehetséges emlős mutagének és karcinogének szűrésére. Az egér limfóma timidin-kináz (TK) vizsgálat része az *in vitro* vizsgálatok egy csoportjának, melyek célja a kockázatbecslés előrejelzése az *in vivo* vizsgálatokat megelőzően. Alkalmazható szubsztitúció, transzlokáció, deléció, génkonverzió detektálására (Lloyd & Kidd 2012). A genotoxicitást vizsgáló tesztek közé tartoznak még többek között: *in vitro* SCE (*Sister Chromatid Exchange*- testvérkromatida kicserélődés) vizsgálat emlős sejteken (OECD TG 479).

Az EFSA 2011-ben megvizsgálta a tudomány aktuális állását genotoxikológiai vizsgálatokkal kapcsolatban. Összeállítottak egy többlépcsős rendszert a genotoxicitás vizsgálatához, mely bakteriális reverz mutációs vizsgálattal, valamint *in vitro* mikronukleusz teszttel kezdődik, majd ha nem meggyőző vagy ellentmondásos eredmény születik, folytatódik *in vivo* tesztekkel, melyek között a transzgenikus rágsáló sejt génmutációs vizsgálat (OECD TG 488) és az *in vivo* emlős eritrocita mikronukleusz vizsgálat (OECD TG 474) mellett szerepel a comet assay (OECD TG 489) is (4. ábra). Disszertációmban a 4-etilbenzaldehyd örökítőanyagra gyakorolt hatását nem csupán comet assay, hanem az EFSA ajánlás alapján mikronukleusz teszt segítségével is megvizsgáltam. A módszerek ezen kombinációban történő alkalmazására számos példát találunk a szakirodalomban.



4. ábra Az EFSA által ajánlott genotoxicitás vizsgálati stratégia (Glei et al. 2016 alapján)

### 3.8.1. A comet assay

A comet assay vagy más néven SCGE módszer (*Single Cell Gel Electrophoresis Assay*- egy sejtés gél elektroforézis vizsgálat) egy egyszerű és érzékeny technika, amely alkalmas a DNS károsodás kimutatására az eukarióta sejtekben. A „comet”, vagyis „üstökös” kifejezés arra utal, hogy a DNS töredékek elmozdulása a gélben üstökösre hasonlít (Tice et al. 2000).



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

1984-ben Ostling & Johanson (1984) egy mikrogél elektroforézis technika kidolgozásával javította a DNS egyes sejtekben történő kimutatására alkalmas módszer érzékenységét, a módszert ekkor „mikroelektroforézisnek” hívták. Azt találták, hogy a magtól eltávolodó DNS darabkák mennyisége arányos volt a sejteket érő ionizáló sugárzás dóziséval. Az elektroforézis és a lízis semleges körülmények között zajlott.

Singh és munkatársai (1988) változtattak a módszeren, alkalikus körülmények között végezték a vizsgálatot, amely kellően érzékennyé tette a comet assay-t genotoxicitási vizsgálatok elvégzéséhez is. A sejteket tárgylemezre öntött agaróz gélbe ágyazták, majd detergenssek és sóoldat segítségével lizálták, majd az alkalikus pufferben elektroforézist hajtottak végre. A DNS mivel negatív töltésű, a pozitív pólus irányába vándorolt. A DNS festésére etídium-bromidot használtak, míg az értékelést fluoreszcens mikroszkóppal végezték. A képződött csóva nagysága arányos a DNS károsodásának mértékével. A semleges közeg csak a kétszálú DNS törések kimutatását teszi lehetővé, az egy szálát érintő károsodások kimutatását nem. Mivel egyszálú törések gyakrabban keletkeznek, mint kettős szálú törések, a semleges feltételek nyilvánvalóan nem olyan érzékenyek a DNS károsodás kimutatására, mint a lúgos közeg. A változtatással tehát lehetővé vált az egyszálú DNS törések értékelése is. A módszer megváltoztatásának további előnye, hogy a lúgos körülmények hatására a sejtben található RNS is lebomlik, így nem zavarja a kimutatást. A módszert csak később, 1990-ben nevezték el „comet assay”-nek Olive és munkatársai (1990).

Kifejlesztése óta az alkalikus comet assay-t széles körben alkalmazzák. A módszer ezen változata alkalmas az SSB-k (*single-strand breaks*- egyszálú törések), az ALS-ek (*alkali-labile sites*- alkáli-labilis helyek), a DNS-DNS/ DNS-fehérje összekapcsolódások (*cross-linking*), hiányos javító helyek miatt kialakult SSB-k kimutatására. A többi genotoxikológiai módszerrel szemben a comet assay nagy előnye, hogy kellően érzékeny a kismértékű DNS károsodás kimutatásához, viszonylag kevés sejt kell hozzá, rugalmasan alakítható a vizsgálati anyaghoz és a kísérleti elrendezéshez, olcsó, könnyen és gyorsan kivitelezhető.

A módszer jelentős fejlődésen ment át. Kezdetben a jelen dolgozatban is alkalmazott, mikroszkóp tárgylemezre öntött, egy vagy két gélmezőt alkalmazó módszer volt az elterjedt, azonban a módszer gyorsítása, valamint áteresztő képességének növelése érdekében a kutatók folyamatosan fejlesztik azt. Az egyik ilyen lehetőség egy 3 mm vékony szilikon tömítő eszköz használata, mely lehetővé teszi 12 külön álló, kis gél létrehozását egy lemezen (Shaposnikov et al.

2010). Egy norvég kutatócsoport kifejlesztett, majd sikeresen validált egy olyan változatot, melyben minigélt hoztak létre hidrofil poliészter film segítségével. Ez a nagy áteresztő képességű módszerrel bármilyen sejt vagy szövetminta vizsgálható, és különösen hasznos, ha nagy mintaszámot kell feldolgozni (Gutzkow et al. 2013). A módszer legújabb verzióinak már óriási áteresztő képessége van, a CometChip technológia tulajdonképpen egy microarray, melyben sejtnyi méretű lyukakban ágyazzák agarózba a sejteket (Watson et al. 2014). A másik új változat az agaróz alapú multilfluid chip (100 pararell mikrocsatorna, 20x20  $\mu\text{M}$ ), mely 10 000 különálló sejtről szolgáltat DNS károsodással kapcsolatos információt (Li et al. 2013).

Comet assay segítségével nem csupán a károsodások, hanem a javító mechanizmusok is hatékonyan vizsgálhatók (Azqueta & Collins 2013, Azqueta et al. 2014, Collins 2014). A módszerrel egyszerűen vizsgálható a javító mechanizmusok kinetikája, a károsító hatás után bizonyos időközönként elvégzett vizsgálattal, ezt challenge tesznek nevezzük (Au et al. 2010). A javító mechanizmusok vizsgálatára fejlesztették ki a comet assay és a fluoreszcens *in situ* hibridizáció kombinációját, a comet-FISH assay-t (Glei et al. 2009, Glei & Schlörmann 2014), mely bizonyos gének vagy DNS szekvenciák károsodásának vagy akár javító mechanizmusainak vizsgálatára alkalmas (Glei et al. 2007, Shaposhnikov et al. 2011).

A vízi élőlényekkel kapcsolatos toxikológiai vizsgálatokban előszeretettel alkalmazzák ezt a módszert. A többi élőlényhez hasonlóan lehetőség van *in vitro* vizsgálatokra, különböző sejtek vagy szövetek vizsgálatával, illetve nagyon elterjedtek az *in vivo* vizsgálatok is, mikor az egész élőlényt vetjük alá a vizsgálatnak, majd bizonyos sejteiből vagy szöveteiből veszünk mintát a vizsgálatokhoz. A vizsgálatok során a szárazföldi állatokhoz hasonlóan előszeretettel vizsgálják a különböző vérsejteket, illetve vért magát, továbbá az állatok máját, illetve igen gyakori az embriók alkalmazása az *in vitro* tesztekben. A laboratóriumi vizsgálatokon kívül terepi minták tanulmányozására is alkalmazzák a módszert, szennyezett, valamint referencia területen élő állatokból gyűjtenek mintát ez esetben, és ezután hasonlítják össze az eredményeket. Ilyen jellegű vizsgálatokat főként mezőgazdasági és ipari területek közelében végeznek, hiszen a leggyakoribb szennyezések ezekből az iparágakból kerülnek a környezetbe. Az Egyesült Államokban számos ilyen vizsgálatot végeztek az elmúlt két évtizedben. Georgia Államban toxaphen hatóanyaggal szennyezett folyótorkolatból gyűjtött üveggarnéla (*Palaemonetes pugio*) és atlanti fogasponty (*Fundulus heteroclitus*) egyedekből gyűjtöttek mintákat, a rákok esetében embriókat, míg a halak esetében vérsejteket, és igazolták a módszer segítségével, hogy károsodott a sejtekben található örökítőanyag (Lee et al. 1999; Maruya et al. 2000). A Rhone folyóban élő domolykó populáció esetében is szignifikánsan megemelkedett a DNS töredezettsége a szennyezett területekről vett mintákban a szennyeztelen területekről származókhoz képest (Devaux et al. 1998). Az ilyen jellegű, terepi mintákon alapuló vizsgálatok nem alkalmasak az egymással való összehasonlításra,

hiszen nem csak egy adott anyag van jelen a vizsgált környezetben, illetve egyéb kondíciók sem egyeznek meg. Vitathatatlan azonban, hogy ez a módszer és a terepi minták vizsgálata alkalmas arra, hogy képet kapjunk egy-egy terület élővilágának aktuális állapotáról, illetve veszélyeztetettségéről.

A laboratóriumi vizsgálatok során számos fajjal dolgoznak világszerte. Ezeknek a tanulmányoknak a közös jellemzője, hogy kontrollált körülmények között, egy bizonyos szennyező anyag ismert koncentrációit alkalmazzák, így dózis-hatás összefüggések is vizsgálhatóak. Leggyakrabban tehát teljes vérből vagy vérsejtekből (Machado et al. 2013, Cavas 2011, Buschini et al. 2004), kopoltyú- és májsejtekből (Abd-Allah et al. 1999, Deventer et al. 1996) származó mintákon végzik el a vizsgálatokat.

A kifejlett egyedekből származó minták mellett nagy jelentősége van az embriók és egyéb korai fejlődési stádiumok alkalmazásának. A korai fejlődési stádiumban lévő egyedek többféleképpen is felhasználhatóak a comet assay vizsgálathoz. Mivel a testméret még igen kicsi, így az egyes szervek izolációja tulajdonképpen lehetetlen. Kézenfekvő megoldás a teljes test homogenizátumok készítése. Morin és munkatársai (2011) korai, szikzacskós lárva stádiumú medaka egyedeket használtak vizsgálataikhoz. Módszerük lényege, hogy csoportonként öt darab, 2 dph (*days post hatch* – kikelés után eltelt napok száma) korú lárvát Petri- csészébe helyeztek, majd eldobható szikével óvatosan felvagdosták azokat. Ezután 2 ml-es csövekbe helyezték a mintákat, majd 1,25% (w/v) kollagenázzal kezelték azokat, 37 °C-on, 45 percig, finom rázogató mellett. A kollagenáz kezelés hatására a szövetek szétestek, így egy teljes testszuspenziót kaptak, és ennek a felhasználásával végezték el a comet assay-t.

A zebradánió embrióinak vizsgálatára is kifejlesztettek egy módszert, mellyel 72 hpf vagy annál idősebb embriók/lárvák esetében is alkalmazható a módszer. Az embriókat 72 hpf kezelik a vizsgálati anyaggal, majd csoportonként nyolc egyedet 2 ml-es üveg szövetaprító készülékbe helyezik, 50-70 µm fal-örlőfej távolág alkalmazásával. Hogy a homogenizáció során a sejteket megfelelő kondíciók között tartsák, 1,5 ml Leibovitz L15 oldatot használnak. A sejtszuspenziót 70 µm áteresztő képességű szűrőn átszűrik, megelőzve ezzel szövetmaradványok bentmaradását a szuszpenzióban. Centrifugálás után ellenőrzik a sejtek életképességét és kizárólag a 75%-nál több élő sejtet tartalmazó mintákkal dolgoznak tovább (Kosmehl et al. 2007).

A sejtizolációt alkalmazó módszerek hátránya, hogy az olyan fontos lépések, mint az elkábítás, ismételt szövetaprítás a homogenizáló médiumban, szűrés és centrifugálás, nagyarányú sejtsérüléshez vezetnek (Kosmehl et al. 2006, 2007; Simon et al. 2011). Továbbá ezeket a vizsgálatokat idősebb, 2-6 napos embriókkal végezték, melyek szervei és szövetei eltérően reagálhatnak a genotoxikus anyagokra, megnehezítve ezzel az eredmények értékelését. Ezen hátrányok kiküszöbölésére fejlesztették ki Eleršek és munkatársai (2013) az 1 dpf korú zebradánió

embriókra alkalmazható, teljes embriót felhasználó módszert. Az embriók a fejlődés első 24 órájában még kevésbé differenciált sejteket tartalmaznak (Kimmel et al. 1995), ezért sokkal egységesebb sejtpopulációkkal végezhető el a vizsgálatok. Emellett további előnye sejt kultúrákkal szemben az embriók használatának, hogy az egész szervezetet reprezentálják, annak összes fiziológiai tulajdonságával. A 24 hpf korú zebradánió embrióval végzett comet assay vizsgálat módszertani részletezésére az „Anyag és módszer” fejezetben kerül sor, mert a disszertáció szerves részét képező, fontos módszerről van szó.

### 3.8.2. A mikronukleusz assay

A mikronukleusz teszt alapjait Howell és Jolly fektették le, mikor a 19. században macskák és patkányok vörsejtjeiben zárványokat fedeztek fel. Ezeket, az akkor még Howell-Jolly testeknek nevezett képleteket anémiás betegek vérmintáiból származó eritrocitákban is kimutatták. Evans és munkatársai (1959) kvantifikálták először a kromoszóma aberrációkat, lóbab (*Vicia faba*) csúcsajtásaiiban kialakuló mikronukleuszok számának meghatározásával. Boller és Schmid (1970) eritrocitákban kialakuló mikronukleuszokat vizsgált, egy erősen alkiláló hatóanyaggal, trenimonnal történő kezelés után. Kísérleteikhez kínai hörcsögöket használtak, a sejteket csontvelőből és perifériás vérből nyerték. Ebben a tanulmányban nevezték először a módszert 'Mikrokern-Test'-nek. A módszer alapjainak kidolgozásához Schmid zürichi kutatócsoportja mellett nagyban hozzájárult John Heddle (1973) is a Kaliforniai Egyetemen, így már nem csak a mikronukleuszok jelenlétét lehetett kimutatni, de számszerűsítésükkel dózis-hatás összefüggések is vizsgálhatóvá váltak.

A mikronukleuszok mitotikus osztódáson áteső sejtekben alakulnak ki. Ha a kromoszómákat valamilyen káros behatás éri az anafázisban, a telofázis után a kromatin állomány sérült része nem kerül a sejtmagba, hanem az utódsejt citoplazmájában képez egy vagy több, a sejtmagnál kisebb, membránnal körülhatárolt egységet, mikronukleuszt. A mikronukleusz teszt tehát nem a kromoszómák direkt megfigyelésére alkalmas az osztódás metafázisában, így nem tekinthető a metafázis analízis vagy egyéb kromoszóma aberrációs vizsgálatok alternatívájának. A kromoszóma aberrációkat nem tudjuk osztályozni ezen módszer alkalmazásával. A mikronukleusz teszt főbb sajátosságai: kariotípusra való tekintet nélkül mindenféle osztódó sejtpopuláción alkalmazható, alkalmas a pontos adatgyűjtésre az egyszerű és jól definiált vizsgálati végpont miatt, az osztódási orsóra (tehát a mitotikus apparátusra) gyakorolt hatások is detektálhatóak, a természetes módon előforduló mikronukleuszt tartalmazó sejtek aránya általában állandó. Hátrányként említhetjük, hogy a kromoszóma aberrációk nem osztályozhatók ezzel a módszerrel, és bizonyos körülmények között pseudo-mikronukleuszok keletkezhetnek. Számos előnye és könnyű kivitelezhetősége miatt épült be a toxikológia gyakorlatába.

Jelenleg az OECD TG 474 irányelv írja le a módszer pontos kivitelezését, a megfelelőségi kritériumokat és az értékelés szabályait. Az irányelvet emlősök eritrocitáiban kialakuló mikronukleuszok vizsgálatára dolgozták ki, így egéren és patkányon kívül más emlős modell szervezet is alkalmazható. A módszer első leírásához és alkalmazásaihoz hasonlóan a teszt során csontvelőből vagy perifériás vérből kell mintát venni, majd a már ismertetett festési módszerrel megfesteni a mintákat. Lehetővé teszi a manuális, valamint a képalkotó és elemző szoftverekkel történő automatizált értékelést is. Ezek a modern megoldások nem csupán időhatékonyak, de kimutatták, hogy a vizsgálatok mind laboratóriumokon belüli, mind pedig a laboratóriumok közötti ismételhetsége és érzékenysége is jobb, mint a manuális mikroszkópos vizsgálat esetén. A vizsgálat részeként elkülöníthetők a mikronukleuszokba záródott kromoszóma fragmentumok a teljes kromoszómáktól a bennük lévő kinetokór megfestésével. Így nem csupán a kromoszómák szerkezetét, de az osztódási apparátust ért káros hatások is kimutathatóvá válnak.

A mikronukleusz teszt tehát egy eredendően emlősökre kidolgozott módszer, ám a kutatók figyelme az emlős modellek mellett a halak felé fordult. A módszer halakon történő alkalmazását az emlős modellek korlátozó tényezői (állatvédelem, fals-pozitív sejtek) hívták életre, hiszen kiegészítő gerinces modell szervezetet kerestek. A halak alkalmazásának előnye, hogy könnyen tartható, olcsó tesztorganizmusok, valamint a fals-pozitív eredmények előfordulási esélye is kisebb.

A vízi környezetre ható genotoxikus hatások tanulmányozására már korábban is használtak halmodelleken végzett citogenetikai vizsgálatokat, melyek főként a kromoszómák szerkezetváltozásait tanulmányozták (Kligerman et al. 1975, Prein et al. 1978, Hooftman 1981).

A mikronukleusz teszt halmodellen való alkalmazhatóságának lehetőségét először Hooftman és de Raat írta le (1982). Tesztorganizmusként az észak-amerikai pócot (*Umbra pygmea*) alkalmazták, a vizsgálati anyag pedig egy ismert mutagén, az etil-metánszulfonát (EMS) volt, mivel a kutatócsoport más módszerek alkalmazásával már korábban bebizonyította, hogy ez az anyag ezen halfaj esetén kromoszóma károsodást okoz. Eredményeik alapján az EMS valóban a sejtmag károsodását okozta, valamint megállapították, hogy a mikronukleusz teszt Schmid és munkatársai által leírt tulajdonságai jellemzőek a halakból származó mintákra is.

A halak alkalmazásának előnye az emlős modellekkel szemben, hogy az érett eritrocitáik is tartalmazzak sejtmagot, ellentétben az emlősökkel. Ez a tulajdonságuk megkönnyíti a fragmentumok azonosítását a sejtek citoplazmájában. A mintavétel heparint tartalmazó fecskendővel vagy üvegkapillárisal történik. Ezután a mintát azonnal szét kell oszlatni egy mikroszkóp tárgylemezen. Tizenöt percnyi, etanolban történő fixálás után a lemezeket légszáraz állapotig szárítják, ezek után pedig 5%-os Giemsa oldattal festik. Egyedenként 3000 sértetlen citoplazmájú sejtet értékelnek. Azok az eritrociták tekinthetők mikronukleusszal rendelkező

sejtnak, melyek: (1) a mikronukleusz mérete a sejtmag méretének legfeljebb egyharmada, (2) a mikronukleusz nem érintkezik a sejtmaggal, (3) a mikronukleusz egy nem törött, kerek vagy ovális alakú képlet, mely ugyanúgy festődik, mint a sejtmag (Al-Sabti&Metcalfé 1995).

A mai mutáció kutatási protokolloknak nem szerves része a teszt halakon végzett változata, ám a módszer könnyű kivitelezhetősége és pontossága miatt számos területen alkalmazzák. Az alaposabb megfigyelés érdekében többnyire nem önállóan, hanem egy komplex vizsgálati rendszer részeként szerepel. Számos kutatásban a fejezetben fentebb részletezett comet assay-vel együtt használják. Ennek oka az, hogy bár mindkét módszer a DNS töredezését vizsgálja, ám más szemszögből. A két módszer egyidejű alkalmazása különösen kifejlett halak esetén kézenfekvő, mivel egy-egy állatból mindkét módszerhez nyerhető minta, így komplexebb képet kaphatunk egy vegyület hatásairól, a felhasznált kísérleti állatok számának csökkentésével. Erre kiváló példa egy nemzetközi együttműködés eredményeként létrejött kutatás, melyben egy kemoterápiás szer, az 5-fluoro-uracil alacsony koncentrációinak genotoxicitását vizsgálták kétgenerációs kísérleti rendszerben. Az állatok kíméletes eutanáziája után eltávolították a kopolytút, a májat és a gonádokat az egyedekből. Ezek, valamint a vérmiták felhasználásával végezték el a comet assay-t. További vérmintákat vettek minden egyedből, melyet azonnal, vékony rétegben eloszlattak a mikronukleusz teszthez üveg tárgylemezekre, ahogy az fentebb, a módszer leírásánál olvasható. A comet assay eredményei azt mutatták, míg a kopolytútból és a gonádokból vett mintákon nem volt szignifikánsan magasabb a DNS-töredezettség mértéke a kezelt csoportokban, mint a kontroll csoport esetében, addig a májban, illetve a vérben is szignifikánsan megnövekedett a töredezettség mértéke. Ezzel nagyon jól korrelálnak a mikronukleusz teszt eredményei, hiszen a comet assay által kimutatott DNS töredezettségének mértékéhez hasonlóan a kialakult mikronukleuszok száma is szignifikáns emelkedést mutat a kezelt csoportokban. A változások a mikronukleusz teszt esetében egyértelműen dózisfüggőnek bizonyultak (Kovács et al. 2015.)

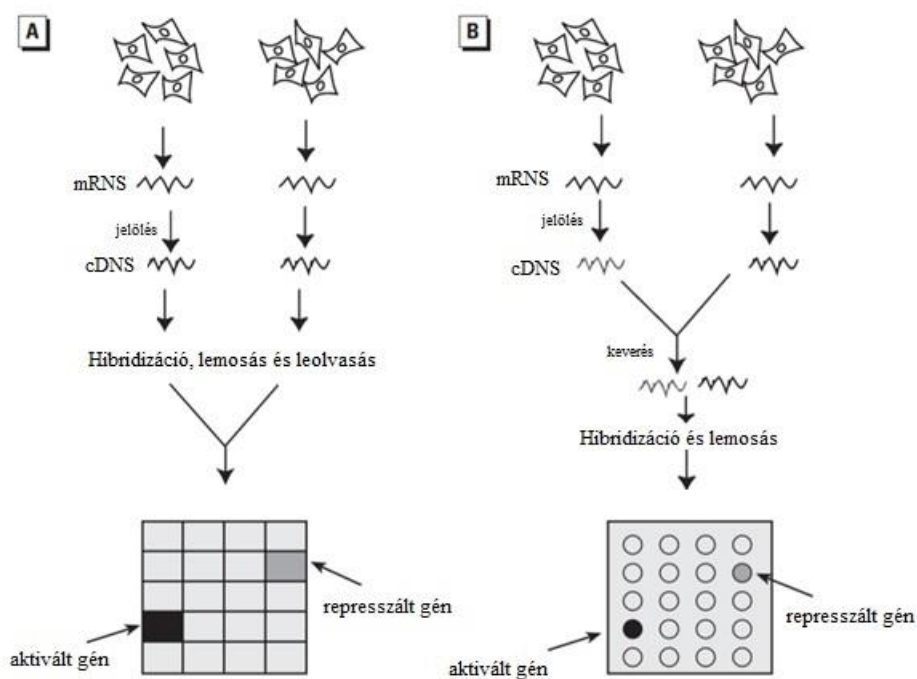
Jól látható tehát, hogy a genotoxikológiai vizsgálatokban, azokon belül is a comet assay és a mikronukleusz teszt módszerek esetén az emlős modellek mellett a halak is kiválóan alkalmazhatók. Bár a szabványok ezidáig emlős modellekre kerültek kidolgozásra, a kutatások egyre inkább arra mutatnak, hogy szükséges lenne a módszerek szabványosítása halmodellekre, továbbá beépítésük a toxikológiai tesztelés nemzetközi gyakorlatába.

### **3.8.3. A microarray assay**

A génexpresszió vizsgálata lehetővé teszi, hogy megvizsgáljuk, az élőlények sejtjei hogyan reagálnak a környezeti hatásokra. Vizsgálhatjuk az egyes anyagok hatásmechanizmusát, esetleg kereshetjük azok „genetikai ujjlenyomatát” az azonosításukhoz, azaz megnézhetjük, hogy hogyan változik a gének expressziós mintázata. Minél több anyag génexpressziós mintázatokra gyakorolt

hatását ismerjük, annál nagyobb eséllyel tudjuk ezen mintázatok alapján megmondani, hogy például egy komplex környezeti mintában milyen xenobiotikumok lehetnek. Az, hogy egy vizsgálatban tudjuk vizsgálni nagyszámú gén expressziós változásait kémiai és környezeti stresszorokra, teremtette meg a toxikogenomika, mint tudományág alapjait. Természetesen ehhez az is elengedhetetlen tényező volt, hogy megismertük az ember és számos modellállat teljes genomját és számos gén/génkaszkád működését.

Az E. Southern által 1975-ben leírt, róla elnevezett Southern-blot módszer volt az első DNS array, melyben jelölt nukleinsavat vizsgált, szilárd felülethez kötve. A DNS array-k fejlődésének történetében két óriási áttörés történt. Az első, a nem porózus felület (például üveg) használata volt, mely lehetővé tette az array miniaturizálását, így jelentősen növelve annak áteresztő képességét, valamint a fluoreszcens hibridizáció és annak detektálása volt. A második pedig az oligonukleotidok nagy sűrűségű szintézisére alkalmas módszerek fejlesztése, mely lehetővé tette több ezer gén egyidőben történő vizsgálatát. Ezeknek köszönhetően olyan array-eket hoztak létre, melyeken négyzetcentiméterenként akár 250 000 oligonukleotid próba is megtalálható. Ezekben a vizsgálatokban alkalmazhatunk rövidebb, 15-25 nukleotidból álló, valamint hosszabb, 50-120 nukleotidból álló oligonukleotidokat, de akár PCR (*polimerase chain reaction*- polimeráz láncreakció) segítségével amplifikált, 100-3000 bázispár nagyságú cDNS szakaszokat is. Utóbbiak rendkívül erős jelet adnak és nagyon specifikusak, ezért is elterjedt a használatuk. A xenobiotikumoknak kitett sejtekből vagy szövetekből első lépésként kinyerjük az mRNS-t, melyet jelölt cDNS-sé alakítunk, majd az array felületére hibridizálunk, majd egy speciális fluoreszcens festékkel festünk, majd az eredményeket fluorométerrel leolvassuk. Az egyszínű jelölést alkalmazó array (5/A. ábra) esetén két array mezőt használunk (teszt minta és referencia minta) az expressziós profilok kialakításához, az array mezők eredményének egymáshoz illesztésével. A kétszínű jelölést alkalmazó array-k (5/B ábra) egy array mezőt használnak a teszt és referencia mintákhoz, majd a detektálás során a leolvasó berendezés két színt különböző csatornákon olvassa le és értékeli. A géntermékek mennyiségének függvényében megállapíthatjuk, hogy az egyes gének kifejeződése csökken, vagy éppen növekszik. A nyers adatokat bioinformatikai módszerekkel kell kiértékelni, az adatbázisokkal összevetve megállapíthatjuk, hogy mely biokémiai útvonalakban van szerepe az adott, rendellenesen expresszáló géneknek, vagy egyes anyagok genetikai ujjlenyomatára is ráakadhatunk (Lettieri 2005).



5. ábra A DNS-microarray metódusa, Lettieri (2005) alapján A, Egyszínű jelölést alkalmazó array kivitelezésének fő lépései B, Kétszínű jelölést alkalmazó array kivitelezésének fő lépései

A módszer számos előnyének és a fejlesztéseknek köszönhetően a molekuláris toxikológiában általánossá vált alkalmazása. A gyártóknál elérhetőek az egyes modellszervezetekre általánosan használható lemezek, vagy chippek, de igény esetén egyedi chippeket is legyártanak. A módszernek, mint látjuk, számos előnye van. Hátránya, a kivitelezéséhez szükséges speciális felszerelés, illetve az, hogy rendkívül költséges, kiváltképp, ha nem kereskedelmi forgalomban is elérhető chipet használunk, hanem egyedit gyártatunk.

A toxikológiai, azon belül ökotoxikológiai vizsgálatok egyik legnagyobb kihívása a toxikus anyagok hatásmechanizmusának feltérképezése, melyhez számos kutató alkalmazta a fent ismertetett módszert különböző tesztorganizmokon és célszerveken. A génexpressziós profil vizsgálatok mutatják meg számunkra a kapcsolatot a környezeti faktorok és az élőlények genomja között, mely ahhoz vezet, hogy feltárjuk az élőlények környezeti változásokra adott specifikus válaszait. A kétezres évek elején, mikor elérhetővé váltak a teljes élesztőgomba (*Saccharomyces cerevisiae*) genom vizsgálatára alkalmas chippek, természetes és antropogén eredetű stresszorokat vizsgáltak, és azt kapták, hogy a chip alkalmas a stresszorok mértékétől függő génexpressziós változások kimutatására (Causton et al. 2001, Gasch et al. 2000). Mint más toxikológiai módszerek esetén, a microarray vizsgálatoknak is kedvelt alanya a zebraadánió. Hoyt és munkatársai (2003) egyedi chip alkalmazásával vizsgálták a közismerten endokrin rendszert zavaró 4-nonilfenol génexpresszióra gyakorolt hatását. Kilenc, az ösztrogén válasszal kapcsolatos gént azonosítottak



zebradánió embrió modellen. Fetter és munkatársai (2015) feltételezhetően androgén-reszponzív géneket vizsgáltak 11-ketotesztoszteronnak kitett zebradánió embriókon. A DNS microarray-k leolvasása után dózisfüggő expresszió változásokat kerestek. Találtak négy olyan gént, mely a humán ortológok elemzése alapján szerepet játszik a hormonok metabolizmusában.

A halakon kívül természetesen magasabb rendű élőlényekből származó minták, illetve sejtenyészetek vizsgálatára is alkalmas a módszer. Toxikológiai vizsgálatokban gyakran használják génexpressziós profil meghatározásra, illetve az egyes xenobiotikumok hatásmechanizmusainak feltérképezésére (Burczynski et al. 2000, Bulera et al. 2001, Waring et al. 2001). Hamadeh és munkatársai (2002) génexpressziós mintázatokat vizsgáltak különböző kémiai ágensekkel kezelt patkányok májmintáin. Elemzésük hasonlóságokat tárt fel az azonos csoportba tartozó vegyi anyagokkal (peroxiszóma proliferátorok) kezelt állatok génexpressziós profiljai között. Ezzel ellentétben a különböző enzimindukátorokkal kezelt csoportok nagyon jellegzetes génexpressziós profilokat mutattak.

Láthatjuk tehát, hogy a módszer kiválóan alkalmazható számos modellszervezeten. Alkalmas a génexpressziós profilok vizsgálatára, ezáltal akár egyes vegyületcsoportok azonosítására. Továbbá jól alkalmazható az egyes vegyületek hatásmechanizmusának feltérképezésére.

## 4. Anyag és módszer

### 4.1. A kísérletek helyszíne, az állatok tartása

Az akut embrió tesztek, a comet assay-t, valamint a mikronukleusz tesztet és az azokhoz kapcsolódó kezeléseket a Szent István Egyetem Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar, Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet Halgazdálkodási Tanszékén végeztem. A microarray vizsgálatot a Németországban, Lipcsében található Helmholtz Környezetkutató Központban (*Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung – UFZ*) végeztem Dr. Stefan Scholz kutatócsoportjában, a minták elsődleges előkészítését szintén a Halgazdálkodási Tanszéken, illetve a Szent István Egyetem Környezetipari Regionális Tudásközpontjában végeztem.

A kísérletekhez minden esetben AB vonalba tartozó zebradániókat használtam. A halakat recirkulációs rendszerben (Tecniplast ZebTec, Tecniplast, Buggugiate, Olaszország) tartottam. A rendszerben a víz hőmérséklete  $25 \pm 0,5$  °C-os, a pH  $7,5 \pm 0,2$ , a vezetőképesség  $525 \pm 50$   $\mu$ S volt. A halak 14 óra világos, 10 óra sötét fényprogramban voltak tartva. A halak takarmányozása naponta kétszer történt SDS Small Gran (SDS – Special Diets Services Inc.) táppal, élő eleséggként hetente kétszer *Artemia spp.* (SERA GmbH.) naupliust kaptak.

A kísérletekhez szükséges zebradánió embriók előállításához a szaporításra kiválasztott egyedeket a recirkulációs rendszerben nemenként elkülönítve tartottam. A kísérleteket megelőző délután speciálisan erre a célra kialakított, szintén a Tecniplast által gyártott műanyag szaporító edényekbe helyeztem. A hím és nőstény egyedeket átlátszó polikarbonát lemez választotta el, de egy víztestben voltak. Az ívás másnap reggel, a polikarbonát lapok eltávolítása után szinkronizáltan történt.

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.

### 4.2. A vizsgálati anyagok és előkészítésük

Munkám során két víztisztítási melléktermék vegyület, a 4-etilbenzaldehid ( $C_2H_5C_6H_4CHO$ , Sigma – Aldrich Hungary, Budapest, CAS: 4748-78-1) és a 2-4-difluoroanilin ( $F_2C_6H_3NH_2$ , Sigma – Aldrich Hungary, Budapest, CAS: 367-25-9) hatásait vizsgáltam. Az anyagokból első lépésként minden esetben törzsoldatot készítettem, vizes oldatba vitelükhöz Branson S-250D ultrasonikátor berendezést (Branson Ultrasonics, Danbury, USA) használtam, 2 perces időtartamban, 20%-os amplitúdóval.

### 4.3. Vizsgálatok

#### 4.3.1. Előkísérletek

Mivel sem az EBA, sem pedig a DFA kapcsán nem állt rendelkezésemre zebradánio embriókra vonatkozó akut toxicitás adat, ezért előkísérleteket végeztem az akut tesztek megkezdése előtt, hogy megállapíthassam a megfelelő kezelési koncentrációkat a 120 órás embrió vizsgálathoz. Az előtesztet mindkét vegyület esetében 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25 mg/l koncentráció sorral hajtottam végre, kontrollként a recirkulációs rendszer vizét használtam. Minden csoportba 20-20 embriót helyeztem, 5 cm-es Petri-csészékbe, 10 ml oldatba. Az embriókat 27 °C-on inkubáltam (Sanyo MIR-154). Ezek alapján már be tudtam határolni azt a koncentráció tartományt, mely megfelelőnek bizonyult a 120 órás vizsgálatban az egyes anyagok esetén.

#### 4.3.2. 120 órás embrió teszt

Az akut embrió tesztekhez az ikrákat az anyahalak szinkronizált szaporítása után összegyűjtöttem, majd termékenységet sztereó fénymikroszkóp alatt, normál megvilágításban (Leica M205) ellenőriztem. A vizsgálatokat mind a 2-4-difluoroanilin, mind pedig a 4-etilbenzaldehyd esetén az OECD 236: Halembrió akut toxicitás teszt alapján végeztem, 120 órára kiterjesztett vizsgálati idővel. Az embriókat 24 lyukú szövettenyésztő plate-ekbe helyeztem (1 embrió/lyuk) termékenyülés után egy órával, minden esetben koncentrációnként 12 embriót, 4 ismétlésben. Az embriókat a 4. táblázatban feltüntetett koncentrációkkal kezeltem. Mivel a DFA esetén a 200 mg/l-es koncentráció esetén sem volt teljes a mortalitás, jelentősen megemeltem a kezelési koncentrációkat.

<b>Tesztanyag</b>	<b>Koncentrációk (mg/l)</b>
EBA	0,2; 0,5; 1; 5; 10; 12; 15; 17; 18; 19; 21; 23; 25; 27; 29; 30; 35; 40; 50; 60
DFA	500; 450; 400; 350; 300; 250; 220; 200; 180; 100; 50; 1

#### *4. táblázat A 120 órás embrió tesztek során alkalmazott kezelési koncentrációk*

Kontrollként a ZebTEC haltartó rendszer vizét használtam. A plateket 27 °C-on inkubáltam. Naponta vizsgáltam meg minden embriót mikroszkóp alatt, a termékenyülés utáni 120. óráig (120 hpf). Meghatároztam a mortalitást, morfológiai rendellenességeket kerestem, valamint 72 órával a termékenyülés után digitális felvételeket készítettem az embriókról, 30x-os nagyítás mellett, laterális orientációval (Leica M205 mikroszkóp, Leica DFC 425C kamera, LAS V 3.8 szoftver). A mortalitást használva végpontként dózis-hatás görbéket vettem fel, melyekből megállapíthattam az LC<sub>10</sub> és LC<sub>50</sub> értékeket 24 óránként egészen 120 órával a termékenyülés

utánig (120 hpf) SPSS 23.0 szoftvercsomag segítségével. A teljes kísérleteket minden esetben háromszor ismételttem.

#### **4.3.3. LC-értékek meghatározása a 96-120 órás expozíciós ablakban**

Az embriókat 1 hpf életkorban 24 lyukú szövettenyésztő platekbe helyeztem, majd a 96-120 hpf életszakaszban kezeltem 10, 15, 20, 22, 25, 27, 30, 32, 35, 40 mg/l koncentrációkkal, koncentrációnként 12 embriót, 4 ismétlésben, a plateket 27 °C-on inkubáltam. A vizsgálat végén digitális felvételeket készítettem az embriókról, 30x-os nagyítás mellett, laterális orientációval a morfológiai elváltozások dokumentálására. A mortalitást használva végpontként dózis-hatás görbét vettem fel erre az életszakaszra, melyből megállapíthattam az LC<sub>10</sub> és LC<sub>50</sub> értékeket SPSS 23.0 szoftvercsomag segítségével.

#### **4.3.4. Microarray vizsgálat és transzkriptom analízis**

Első lépésként a 4.3.3. fejezetben leírtak szerint megállapítottam az LC<sub>10</sub> értékét a 96-120 hpf expozíciós ablakban, majd ezt alkalmaztam legmagasabb koncentrációnként. Ezzel együtt összesen 5 koncentráción (1,6; 3,2; 6,4; 12,8; 25,6 mg/l), koncentrációnként 6-6 csoportot, csoportonként 50-50 embriót kezeltem. A kezelést 5 cm-es Petri-csészékben végeztem, az embriókat 27 °C-on inkubáltam.

Az embriókat 1,5 ml-es Eppendorf-csövekben homogenizáltam, 200 µl trizolban (TriReagent, Izinta), majd a felhasználásig -80 °C-on tároltam.

Az RNS izolálást 5Prime Phase Lock Gel Heavy kittel végeztem (5Prime GmbH, Germany), a gyártó által biztosított protokoll szerint. Az izolált RNS mintákat ezután Quiagen RNEasy Mini Kittel (Qiagen GmbH, Germany) megtisztítottam, az RNS koncentrációkat NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, USA), a megfelelő mennyiségű RNS-t tartalmazó minták minőségét Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, USA) készülékkel, Agilent RNA 6000 Nano Assay Kit (Agilent Technologies, USA) felhasználásával ellenőriztem.

A microarray vizsgálat során Agilent SurePrint G3 Custom GE 8x60k (Amadid G4102A, Agilent Technologies, USA) arrayt használtam. Minták előkészítését, jelölését, majd a microarray lemezekre történő felvitelét a kifejezetten Agilent Gene Expression Oligo Microarray lemezekhez tartozó 'One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis, Low Input Quick Amp Labeling Protocol' alapján végeztem, melyet a gyártó biztosított (Version 6.6, September 2012, Agilent Technologies, USA). A microarray lemezek leolvasása a Genovia GmbH-nál történt (Zwenkau, Germany) Agilent DNA Microarray Scanner segítségével. A microarray lemezen található mezők fluoreszcens jelének intenzitását Agilent Feature Extraction szoftver (verziószám: 10.7.3.1.) használatával nyertem ki. Olyan mRNS transzkripteket kerestem, melyek expressziója legalább

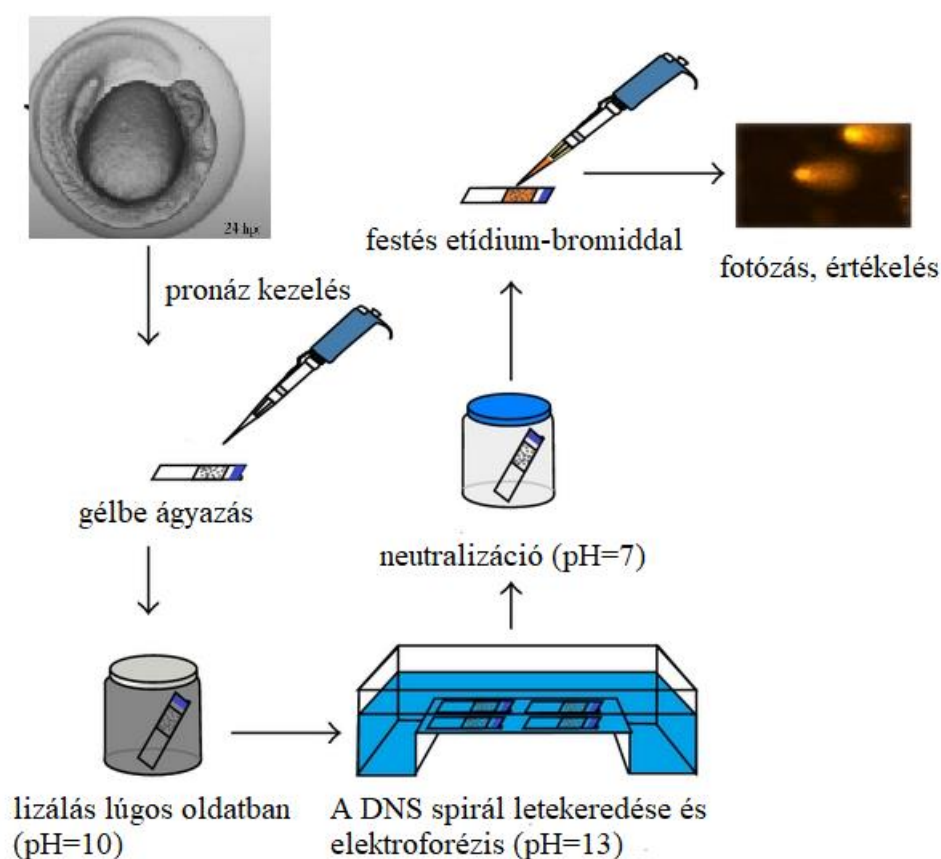
egy koncentráció esetén eltér a kontroll csoportban mért expressziótól, majd elvégeztem a főkomponens analízist Agilent GeneSpring 12 GX szoftver segítségével.

Ezek után megvizsgáltam az EBA által befolyásolt gének génextpressziós mintázatait és három génextpressziós klasztert azonosítottam „*K-mean clustering*” (K-alapú csoport analízis) algoritmus segítségével, szintén az Agilent GeneSpring 12 GX szoftver használatával.

Ezek után DAVID (DAVID Bioinformatics Resources 6.8, Leidos Biomedical Research Inc., Frederick, Maryland, USA) biológiai folyamatelemzéssel meghatároztam az egyes klaszterekbe tartozó gének főbb biológiai funkcióit.

A Klaszter2-be tartozó, EBA által koncentrációfüggően gátolt gének vizsgálatánál a GeneMANIA predikciós szervert használtam, melynek segítségével a gének együttes expressziója és fizikai interakciója alapján azonosítottam egy génhálózatot. A génhálózatba tartozó gének szerepének feltérképezésére az Uniprot és ZFIN adatbázisokat alkalmaztam.

#### 4.3.5. 1 dpf embriókon végzett comet assay vizsgálat



6. ábra A comet assay főbb lépései (Tan & Bajo 2014 alapján)

A vizsgálatot, melynek főbb lépéseit a 6. ábrán szemléltettem, Žegura és Filipić (2004) módszerét alapul véve végeztem, pozitív kontrollként egy szerves peroxidot, Luperox®-ot

(Sigma) használtam. A vizsgálathoz 24 hpf embriók szükségesek. Az embriókat 1 órával termékenyülés után 0,1; 0,5; 1; 2,5; 5; 7,5; 10 és 12 mg/l-es EBA, valamint 20 és 40 mg/l-es Luperox® oldattal kezeltem, negatív kontrollként a ZebTEC rendszer vizét használtam. Az alkalmazott legnagyobb koncentráció az akut embrió tesztben meghatározott LC<sub>10</sub> értéknek körülbelül a fele volt. Az embriókat 5 cm átmérőjű Petri-csészében kezeltem, 24 órán keresztül inkubáltam, 27 °C-on. Koncentrációnként 6-6 embriót kezeltem, 3 ismétlésben. A vizsgálathoz szükséges fully frosted tárgylemezeket (Menzel-Gläser) metanolba helyeztem egy éjszakára. A lemezek leszárítása után felvittem az első réteg agarózt (*Normal melting point agarose*, 1%, Sigma), 80 µl-t mezőnként (2 mező/lemez), melyeket azonnal lefedtem 24x24 mm-es fedőlemezzel (Menzel- Gläser), majd 2 percre jégre helyeztem azokat. Az agaróz megszilárdulása után a fedőlemezeket óvatosan eltávolítottam. Eközben előkészítettem az embriókat, 2 mg/l koncentrációjú pronáz enzim (Sigma) segítségével eltávolítottam az ikrahéjat (4 perc pronáz kezelés, majd 4 rendszervizes öblítés). Mezőnként 1 embriót 60 µl, 1,5%-os alacsony olvadáspontú, PBS-ben (*Phosphate buffered saline*, Sigma) feloldott agarózba (*Low melting point agarose*, Sigma) ágyaztam, a fedőlemezt finoman megnyomva oszlattam szét az embriókat a gélben. A lemezeket 2 percre jégre helyeztem, majd a fedőlemezek eltávolítása után a 5. táblázat szerint elkészített lízis oldatba. Az oldat készítésekor fontos lépés a pH beállítása 10-re, valamint használat előtt 2,5 ml Triton X-100-at (Sigma) kell hozzáadni és óvatosan rázogatva homogenizálni.

5. táblázat A lízis oldat összetétele

Összetevő	Felhasznált mennyiség
NaCl (Lach-Ner)	36,525 g
Na <sub>2</sub> EDTA (Sigma)	9,3 g
TRIS (Fischer Scientific)	0,3025 g
Triton X-100 (Sigma)	2,5 ml
<b>Végtérfogat: 250 ml</b>	

A lemezeket 1 órára 4 °C- ra helyeztem. A DNS fényérzékenysége miatt innentől derengő fényben dolgoztam tovább. A lízis után a lemezeket lecsepegtettem, majd áthelyeztem az elektroforézis kádba, melyet előzőleg már feltöltöttem az elektroforézis oldattal (3000 ml oldathoz: 1,11g EDTA, 90 ml 10N NaOH), 20 percen keresztül inkubáltam 4 °C -on, majd bekapcsoltam az elektroforézis készüléket (BioRad PowerPac Basic, BioRad, U.S.A.), 25 V feszültség és 400 mA áramerősség mellett 20 percen keresztül üzemeltettem. A lemezeket ezután kiemeltem, lecsöpögtettem, majd a neutralizáló oldatba (250 ml oldathoz 12,114g TRIS, pH=7,5) helyeztem és 15 percig inkubáltam 4 °C-on. A lemezeket ezután vízzel átitatott papírral kibélelt edénybe helyeztem, légmentesen lezártam, fotózásig 4 °C-on tároltam. A comet assay protokoll végén a lemezeket 2 µg/l-es etídium-bromid oldattal megfestettem, lefotóztam Nikon Eclipse E600

mikroszkóppal, 510-560 nm hullámhosszú fluoreszcens fényvel, QImaging MicroPublisher 3.3 RTV kamerával és a hozzá tartozó QImaging szoftverrel, majd TriTek CometScore™ Freeware 1.5 szoftver segítségével meghatároztam a DNS%-ot a csóvában. Koncentrációnként 3-3 ismétlésben, ismétlésenként 45 mérést végeztem. A koncentrációk összevetéséhez Kruskal-Wallis tesztet ( $H = 978,714$ ;  $df = 10$ ,  $p < 0,00001$ ), míg a páronkénti összevetéshez Dunn-tesztet alkalmaztam (SPSS 23.0 szoftvercsomag). A kísérletet háromszor ismételt meg.

#### **4.3.6. Kifejlett halakon végzett mikronukleusz teszt**

A mikronukleusz teszthez a módszer sajátosságai miatt kifejlett, 6-8 hónapos egyedeket használtam, melyek a többi vizsgálathoz hasonlóan ebben az esetben is AB zebradánió vonalból származtak. A kísérleti állatokat a 3.1. fejezetben ismertetett tartási körülmények között tartottam. A teszt félstatikus rendszerben történt, a kezelő oldatot kétnaponta cseréltem.

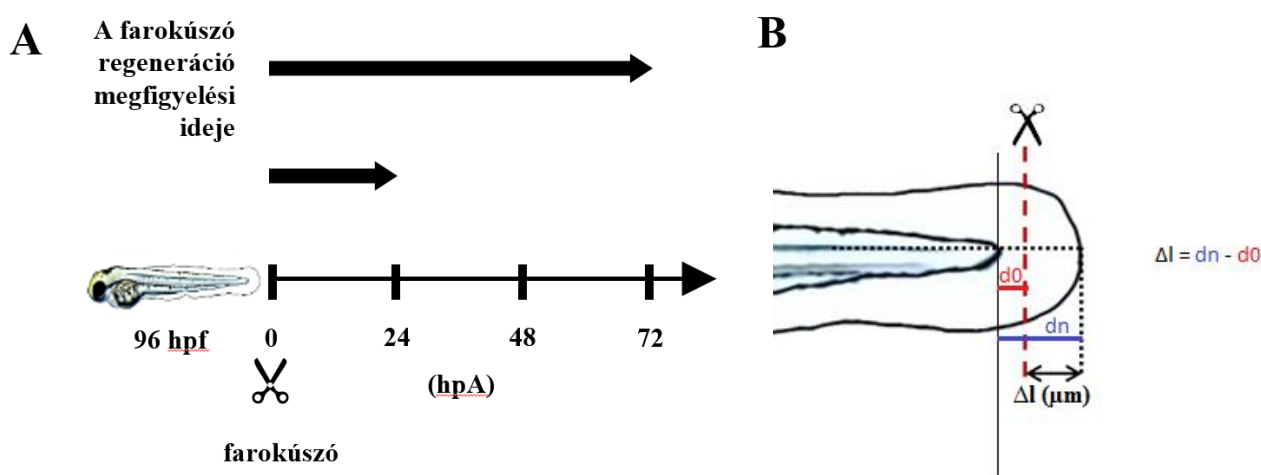
A kezelési koncentrációkat Rácz és munkatársainak (2012) korábbi eredményei alapján határoztam meg. Vizsgálatukban felnőtt halakra vonatkozó  $LC_{50}$ -érték 96 órás kitettség esetén 23,49 mg/l volt. A bevett toxikológiai gyakorlatnak megfelelően, legmagasabb kezelési koncentrációnként a 96 órás kitettség esetén számolt  $LC_{10}$  értéket alkalmaztam (11 mg/l), ezzel elkerülhető a halak idő előtti pusztulása, ám előidézhetőek szubletális hatások. A két további  $LC_{10/2}$  (5,5 mg/l) és  $LC_{10/4}$  (2,75 mg/l) volt. Minden koncentrációból 3 csoportot alakítottam ki, csoportonként 8-8 hallal. A kezelés 21 napig tartott, 7 naponta történt mintavételezés, koncentrációnként 4-4 hal került mintázásra.

Minden mintavétel esetén az állatok életének kíméletes kioltása érdekében azokat MS-222 alkalmazásával túllattam, majd dekapitáltam, ezután vérüket azonnal, vékony rétegben mikroszkóp tárgylemezre (Menzel-Gläser) vittem fel. A vérminták megszáradása után következett a festésük, Hoechst 33342 (5  $\mu$ M) festékkel. A minták vizsgálata epifluoreszcens mikroszkóppal (Olympus BX-51) történt. 400X-os nagyítás mellett, a kéken fluoreszkáló mikronukleuszok kerültek megszámlálásra 2000 véletlenszerűen kiválasztott, ép citoplazmájú eritrocitában minden tárgylemez esetén. Azok a sejtek számítottak mikronukleáltaknak, melyek: 1. mikronukleusza kisebb, mint a sejtmag 1/3-a; 2. ugyanabban a síkban vannak; 3. a mikronukleuszok és a sejtmag ugyanolyan színnel és intenzitással fluoreszkálnak, 4. kerek vagy ovális alakúak; 5. tisztán elkülönül a mikronukleusz és a sejtmag.

A leíró statisztikát STATISTICA 12 szoftvercsomag (StatSoft, Tulsa, OK, USA) segítségével készítettem. Az egyes csoportok összehasonlítására Poisson-regressziót alkalmaztam ( $p < 0,05$ ).

### 4.3.7. Regenerációs kapacitás vizsgálata lárvaikon

A 96 hpf zebra-dánió lárvákat a sebzést megelőzően MS-222 oldatba helyezve elaltattam. Ezt követően az altatásban lévő lárvák farokúszó-végét steril körülmények között, fénymikroszkóp alatt borotvapengével eltávolítottam. Ennek során ügyeltem arra, hogy a sebzés iránya merőleges legyen az állat hossz tengelyére nézve, és minél egyenletesebb vágási felületet eredményezzen. A sebzést követően az állatokról altatásban, oldalnézetben fényképet készítettem fénymikroszkóp alatt. Ezt követően a lárvákat rendszervízzel óvatosan átöblítettem, majd individuálisan a kezelési oldatokat tartalmazó 24-lyukú szövettenyésztő plate-ekbe helyeztem azokat. A 24 órás expozíció elteltével az állatokat rendszervíz segítségével óvatosan átöblítettem, a fent leírt altatási protokoll alkalmazása után fénymikroszkóp alatt oldalnézetben fényképeztem, majd minden kezelési csoporthoz tartozó egyedek kontrol körülmények közé helyeztem. A sebzést követő 48. illetve 72. órában ismét fényképet készítettem a lárvákról. Az elkészült képeket ImageJ szoftver (NIH&LOCI, Wisconsin, USA) segítségével elemeztem. A regeneráció mértékét a lárvák gerinchúrja által kijelölt hossz tengely és az arra merőleges irányú sebzés metszéspontjától mért egyenes vonalú szakasz hosszának növekedése alapján határoztam meg. (A ténylegesen lemerített szakasz kezdőpontját a gerinchúr jól behatárolható vége szolgáltatta, a végpontját pedig a regenerálódó farokúszó aktuális vége.) Az aktuálisan regenerálódott szakasz ( $\Delta l$ ) hosszát úgy határoztam meg, hogy az aktuális teljes lemerített távolságból ( $d_n$ ,  $n=24, 48, 72$  hpA) kivontuk a sebzést követő kiindulási távolságot ( $d_0$ ) (7.ábra).



7. ábra (A) A farok regenerációs vizsgálat kivitelezésének sematikus ábrája (B) A farok lemetszésének sematikus ábrája ( $d_0$ : sebzést követő kiindulási távolság;  $d_n$ : az aktuális lemerített távolság;  $\Delta l$ : az aktuálisan regenerálódott szakasz hossza)



## 5. Eredmények

### 5.1. Előkísérletek

A munkám során vizsgált vegyületek embriókra gyakorolt hatásairól nem állt rendelkezésre toxicitás adat, így első lépésként meg kellett határozni, hogy mely koncentráció-tartományban toxikusak.

Az első előkísérletben mindkét vegyület esetén 200; 100; 50; 25; 12,5 és 6,25 mg/l koncentrációkat alkalmaztam egy-egy határérték-kereső teszt keretein belül. A DFA esetében bebizonyosodott, hogy toxicitása zebradánió embriókra nézve alacsony, hiszen 120 óra elteltével a 100 mg/l-es koncentrációban a kezelt csoportokban alig volt tapasztalható elhullás. A koncentrációk további emelésével megállapítottam, hogy a várható LC<sub>50</sub> értékek 150 és 250 mg/l között lesznek.

Az EBA-n végzett előkísérletek során a legmagasabb koncentrációkban már pár óra elteltével elpusztultak az embriók. A várható LC<sub>50</sub> értékeket 15 és 35 mg/l közé becsültem.

### 5.2. Akut embrió vizsgálatok

#### 5.2.1. 2,4-difluoroanilin

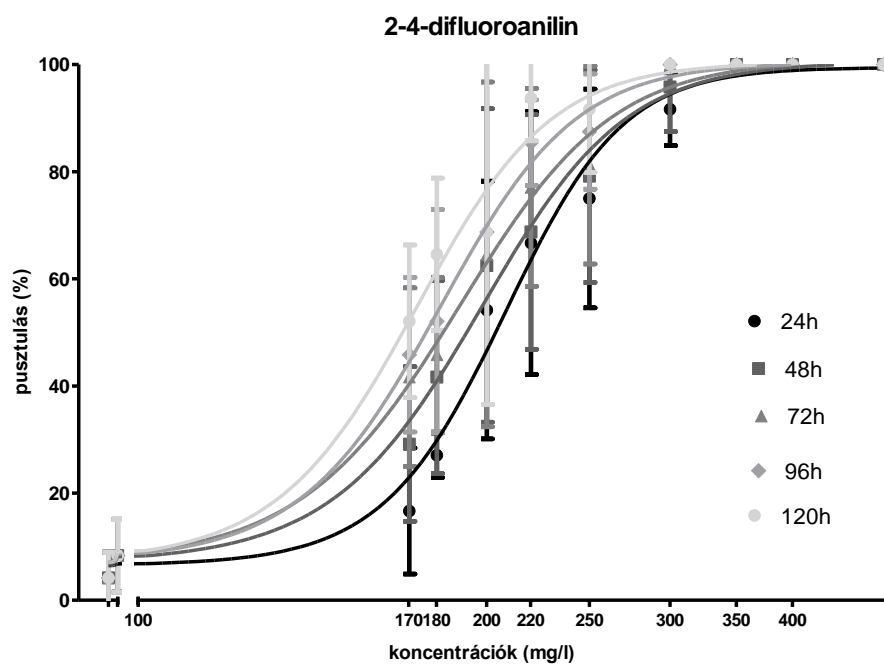
Vizsgálataim során az OECD 236 irányelvet vettem alapul, az embriókat 120 órán keresztül kezeltem 24 lyukú szövettenyésztő platekben. Az embriókról 72 órával termékenyülés után fotókat készítettem a fejlődési rendellenességek dokumentációja és részletes vizsgálata érdekében. Az embriók fejlődése során 24 óránként határoztam meg az LC-értékeket.

A DFA esetében az előkísérletek alapján magas LC-értékeket, tehát alacsony toxicitást vártam, amit a 120 órás embrió vizsgálattal sikerült igazolni. 24 órával a termékenyülés után 207,2 mg/l, 48 órával a termékenyülés után 196,5 mg/l, 72 órával termékenyülés után 187,5, termékenyülés után 96 órával 180,2 mg/l, míg a vizsgálat végén, tehát a termékenyülés után 120 órával 171,6 mg/l volt a vegyület LC<sub>50</sub> értéke, tehát az expozíciós idő növekedésével a vegyület toxicitása is növekedett. A DFA-ra vonatkozó LC-értékeket a 6. táblázatban, a mortalitás dózis-hatás görbéit a 8. ábrán tüntettem fel.

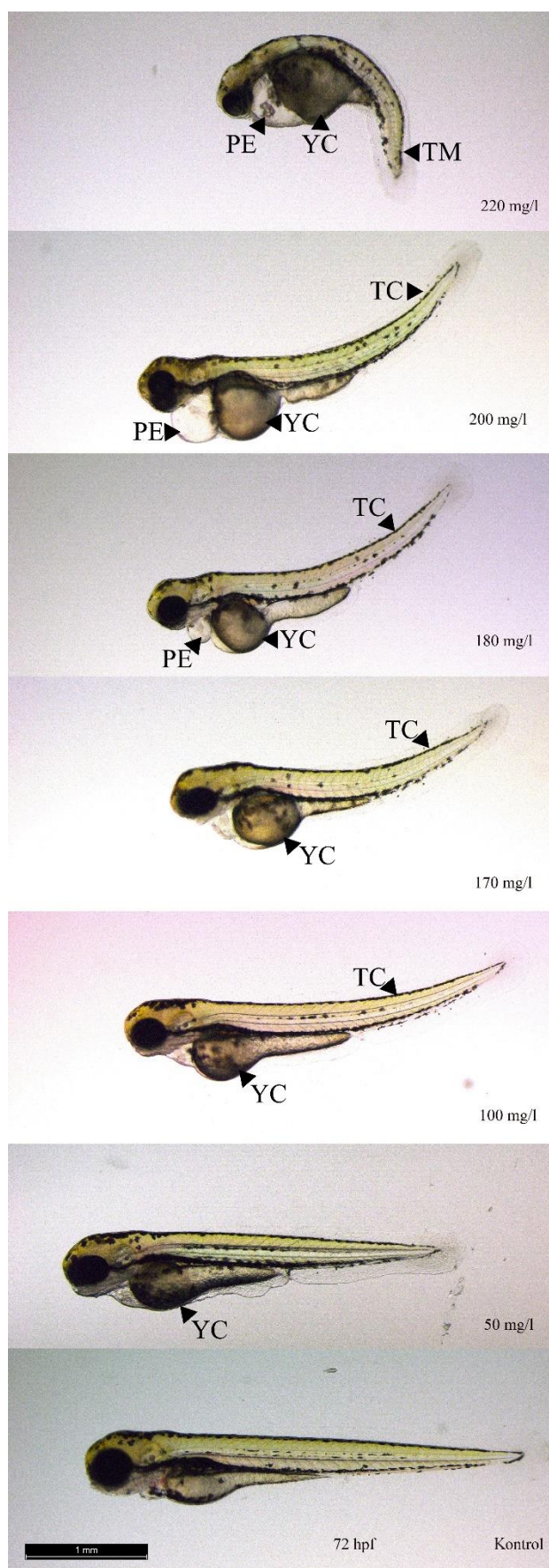
Az embriók mikroszkópos vizsgálata során megfigyelhető volt a zebradánió embriókra jellemző, a mérgező anyagok hatására gyakran kialakuló sziködéma és perikardiális ödéma, valamint a szik szürkés-opállossá válása. A magasabb koncentrációk esetén megfigyelhető volt az embriók farkának dorzális irányba történő elgörbülése, a 220 mg/l-es koncentráció feletti kezeléseknél az embrióknál teljes testtorzulás volt megfigyelhető. Ezek az elváltozások a kontroll csoportban nem jelentkeztek. A jellemző elváltozásokat a 9. ábrán mutatom be.

6. táblázat A 2-4-difluoroanilin LC<sub>50</sub> értékei az expozíciós idők függvényében

hpf	LC <sub>50</sub>
24	207,2 mg/l
48	196,5 mg/l
72	186,5 mg/l
96	180,2 mg/l
120	171,6 mg/l



8. ábra A 2-4-difluoroanilin mortalitásra vonatkozó dózis-hatás görbái (120 órás embrió teszt)



9. ábra A 2,4-difluoroanilin által okozott fenotípusos elváltozások (PE- perikardiális ödéma, YC- elszíneződött szik, TC- fark görbület, TM- farktorzulás)

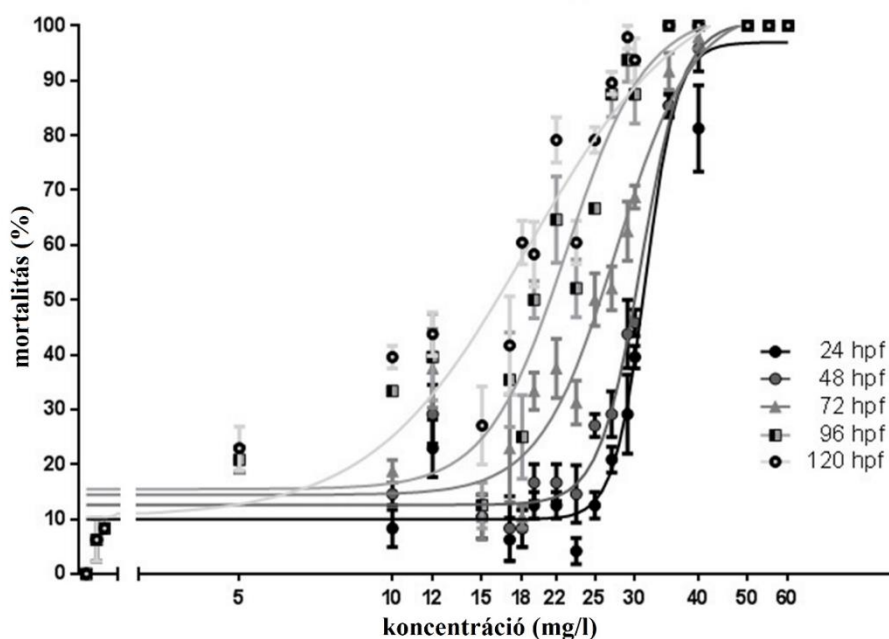
### 5.2.2. 4-etilbenzaldehid

Az előkísérletek alapján az EBA esetén a DFA-hoz képest jóval alacsonyabb LC-értékeket vártam. A 120 órás embrióvizsgálatok során ezt sikerült is bizonyítani. 24 órával a termékenyülés után 31,45 mg/l, 72 órával a termékenyülés után 27,52 mg/l, míg a vizsgálat végén, tehát a termékenyülés után 120 órával 18,44 mg/l volt a vegyület LC<sub>50</sub> értéke, tehát az expozíciós idő növekedésével nőtt az anyag toxicitása. Meghatároztam a további, szubletális hatások tanulmányozására irányuló kísérletekhez támpontként szolgáló LC<sub>10</sub> értékeket is (7. táblázat). A mortalitásra vonatkozó dózis-hatás görbéket a 10. ábrán tüntettem fel.

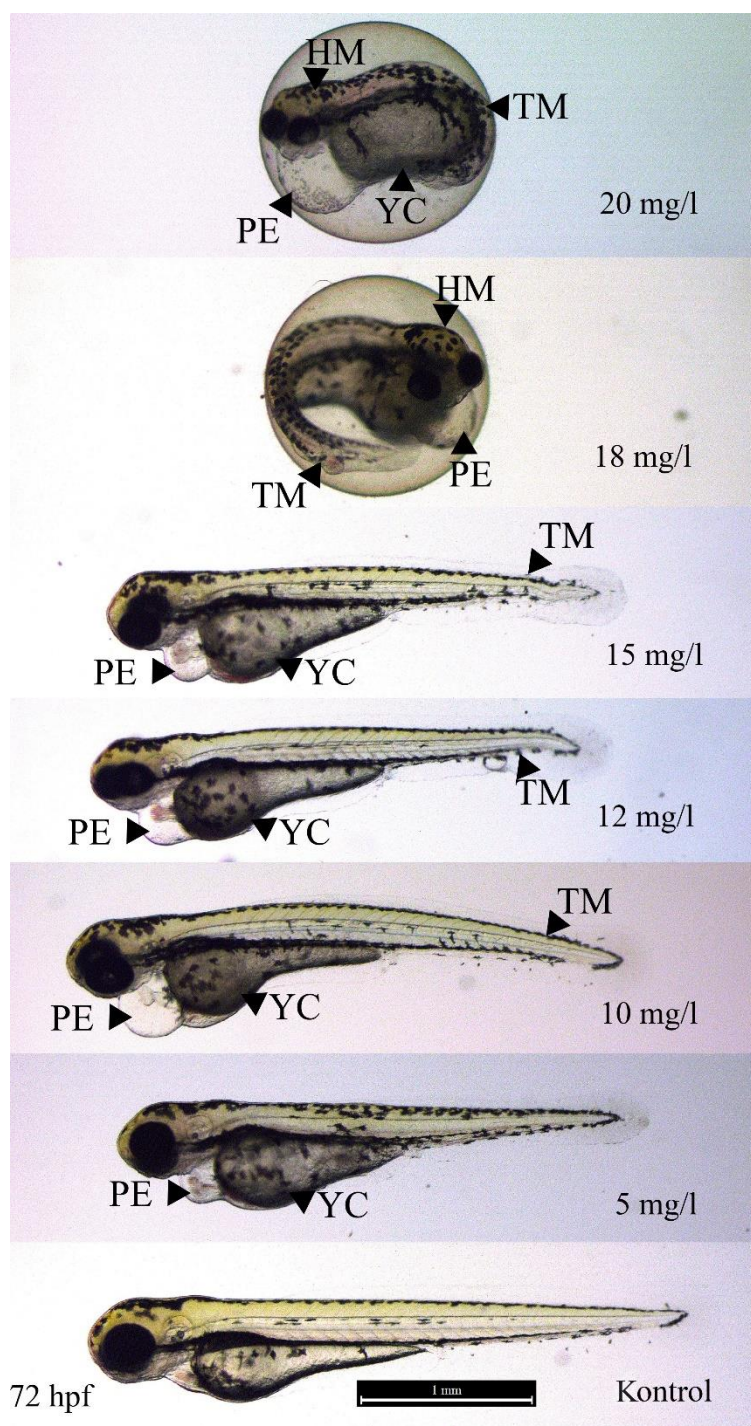
Ezen vegyület esetén is elvégeztem a mikroszkópos morfológiai vizsgálatot. A zebradánióra jellemző elváltozások, mint sziködéma és perikardiális ödéma, valamint a szik opálosodása, a DFA-hoz hasonlóan ebben az esetben is jelentkeztek. Ezeken kívül torz fejlődést tapasztaltam a farki részen, a farknyél környékén, továbbá az úszószegély pereme is szabálytalan volt. Magasabb koncentrációk esetében az embriók nem voltak képesek elhagyni az ikrahéjat, mert súlyos fejlődési rendellenességeik miatt tulajdonképpen mozgásképtelenek voltak (11. ábra).

7. táblázat A 4-etilbenzaldehid LC<sub>50</sub> és LC<sub>10</sub> értékei az expozíciós idők függvényében

hpf	LC <sub>50</sub>	LC <sub>10</sub>
24	31,45 mg/l	26,91 mg/l
48	30,85 mg/l	25,06 mg/l
72	27,52 mg/l	18,81 mg/l
96	22,01 mg/l	14,82 mg/l
120	18,44 mg/l	8,49 mg/l



10. ábra A 4-etilbenzaldehid mortalitásra vonatkozó dózis-válasz görbéi

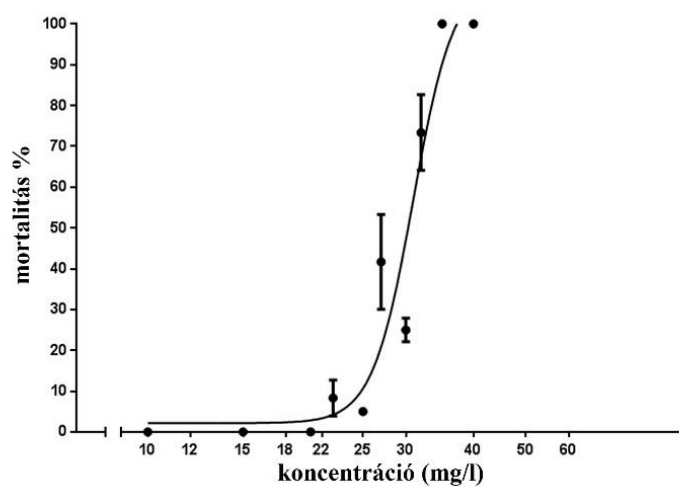
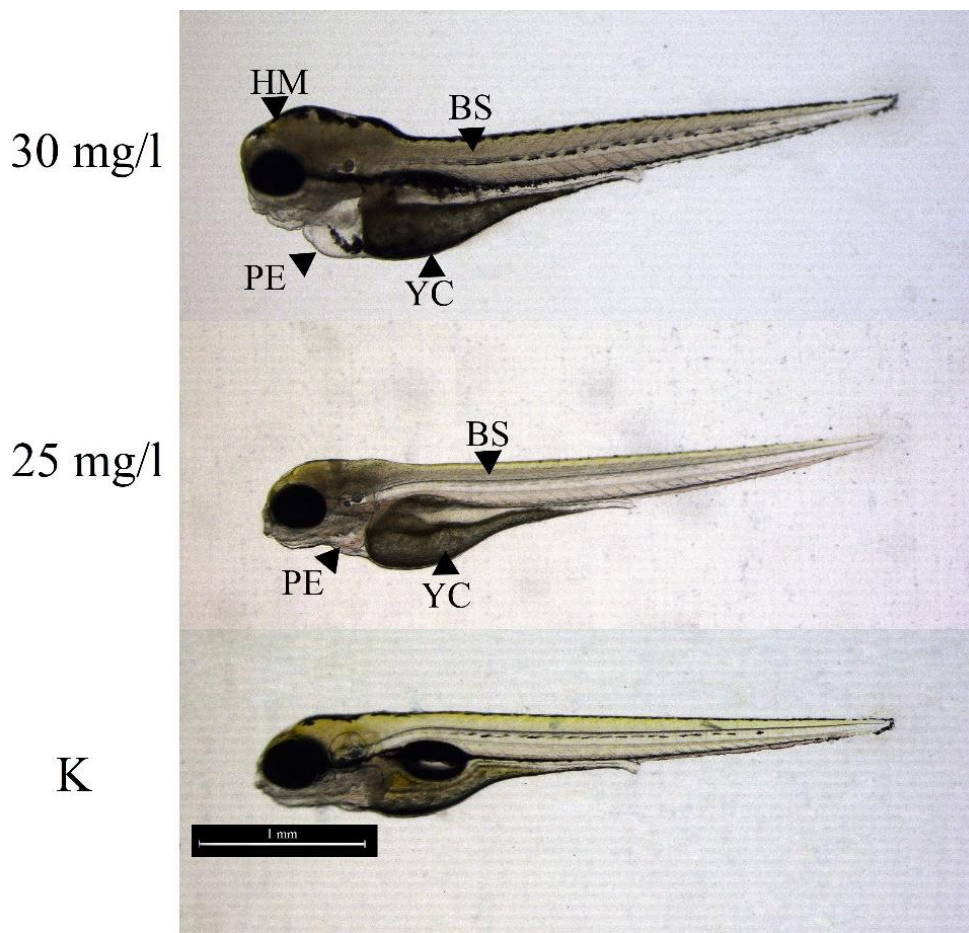


11. ábra A 4-etilbenzaldehyd által okozott fenotípusos elváltozások (PE- perikardiális ödéma, YC- elszíneződött szik, TC- fark görbület, TM- farktorzulás, HM- fejtorzulás)

### 5.2.3. LC-értékek meghatározása a 96-120 órás expozíciós ablakban

A microarray vizsgálathoz szükség volt a 96-120 hpf expozíciós ablakra vonatkozó LC-értékek meghatározására is. Ebben az esetben az embriók csak ebben az időintervallumban voltak kitéve az EBA hatásainak, a kezelés végén ebben az esetben is elvégeztem az embriók mikroszkópos vizsgálatát. Minden kezelt csoportban megfigyelhető volt a perikardiális ödéma, a sziködéma, a testszegmensek összerosódása, valamint a szik szürkés-opálos elszíneződése, az

úszóhólyag hiánya, továbbá a legmagasabb, 30 mg/l-es koncentráció esetén a fej torzulása is. Mivel a microarray vizsgálat szubletális hatások tanulmányozására irányul, ezért ebben az előkísérletben az LC<sub>10</sub> érték meghatározása volt az elsődleges, mely 25,59 mg/l volt, míg az LC<sub>50</sub> 30,94 mg/l (12. ábra).



12. ábra A 4-etilbenzaldehyd által okozott fenotípusos elváltozások és a mortalitásra vonatkozó dózis-válasz görbe a 96-120 hpf expozíciós ablakban (PE- perikardiális ödéma, YC- elszíneződött szik, BS- elmosódott testszegmensek, HM- fejtorzulás)

### 5.3. Microarray vizsgálat és transzkriptom analízis

Az EBA által indukált transzkripció változások meghatározásához a 96 hpf embriókat 24 órán keresztül kezelttem öt különböző koncentrációval, melyek közül a legalacsonyabb 1,6 mg/l, míg a legmagasabb 25,6 mg/l volt. Azokat az mRNS transzkripteket azonosítottam, melyek legalább egy koncentrációban másképp szabályozódtak ( $p < 0,05$ ,  $FC \geq 2$ ), így 721 mRNS mutatott szignifikáns, EBA-dependens regulációt. A PCA (*principal component analysis* - főkomponens analízis) alapján a kontrol és a kezelt csoportok egyértelműen elkülönültek. Az EBA-kezelés a legmagasabb koncentrációban teljesen eltérő mRNS-expressziós profilt eredményezett, mint a kontroll vagy az alacsonyabb koncentrációkkal kezelt csoportok (13.A. ábra).

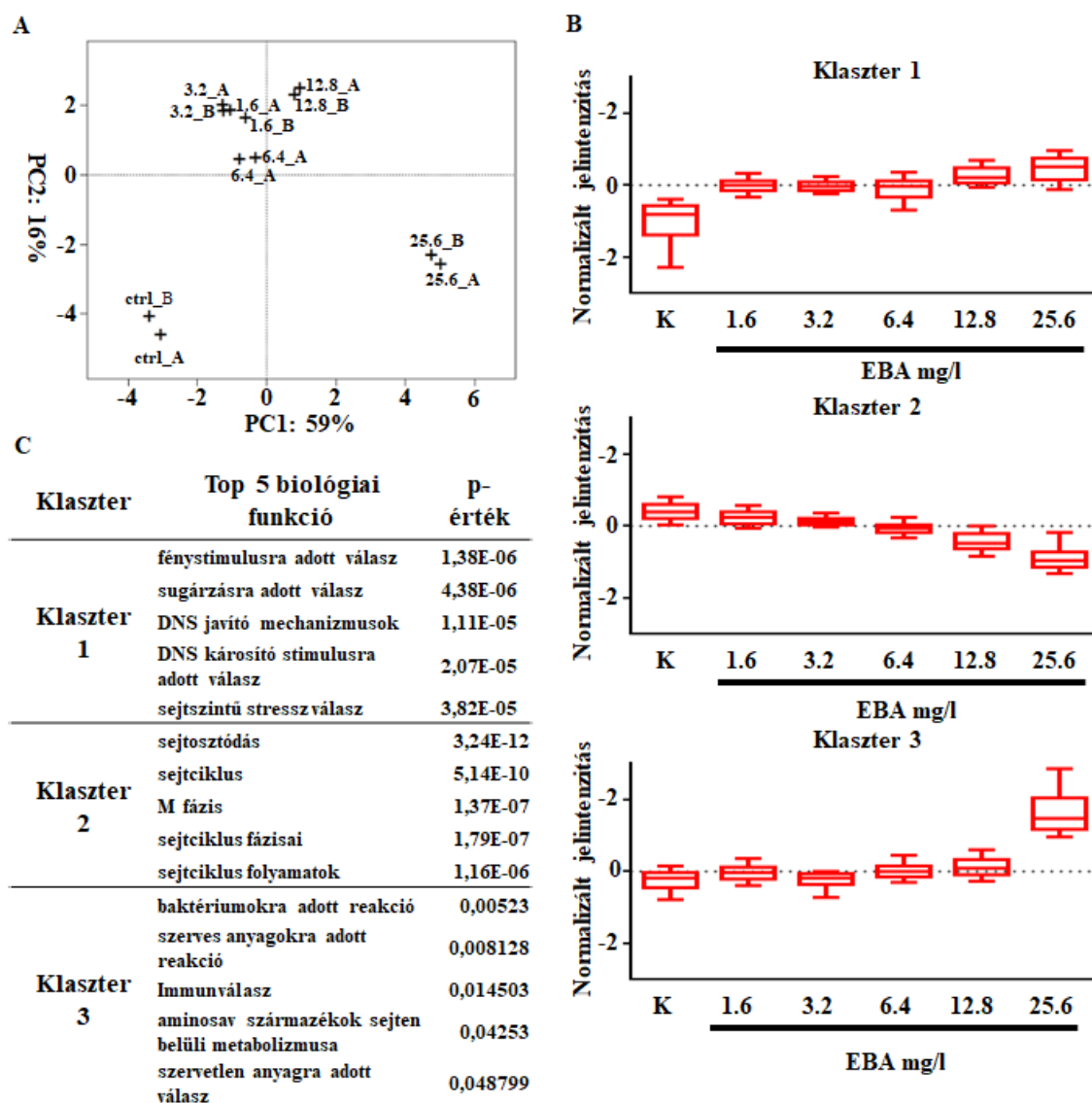
Ezután tovább vizsgáltam a 721 EBA által szabályozott génexpressziós mintázatát, és három különböző génexpressziós klasztert azonosítottam *K-mean clustering* módszer (K-alapú csoport analízis) segítségével (13.B. Ábra). Két EBA-indukált génexpressziós klasztert azonosítottam, mely koncentrációfüggő expozíciót mutatott (13.B. Ábra). A Klaszter1 198 EBA-ra reagáló gént tartalmaz, amelyeket expressziója koncentrációfüggő emelkedést mutatott a zebradánió embriókban. Ezzel szemben a Klaszter3 320 tagja csak a legmagasabb (25,6 mg/l) EBA-koncentrációnál mutatott megnövekedett mRNS-expressziót (13.B. Ábra). Végül 203 gént találtam, amelyeknél az EBA expozíciót követően csökkentett mRNS expresszió mutatkozik (13.B. Ábra, Klaszter2).

Az EBA által szabályozott gének funkcionális tulajdonságainak jellemzése céljából azonosítottam azokat a biológiai funkciókat, amelyek szignifikánsan felülreprezentáltak a különböző, EBA-ra reagáló génexpressziós klaszterekben. A DAVID (DAVID Bioinformatics Resources 6.8, Leidos Biomedical Research Inc., Frederick, Maryland, USA) biológiai folyamatelemzésével számos stressz- és DNS-károsodással összefüggő biológiai funkciókat azonosítottam, ideértve a sejtek stresszreakcióját, a sugárzásra adott reakciót, a DNS helyreállítását és a DNS-károsító stimulusra adott választ, amelyek túlrprezentációja az 1. génexpressziós klaszterre jellemző (13. C. ábra; Klaszter1).

A biológiai folyamatelemzés továbbá azt is kimutatta, hogy a nagy dózisú (25,6 mg/l) EBA-expozíció indukálhatja az immunrendszerrel és a gyulladással kapcsolatos gének expresszióját (13. C. ábra, Klaszter3). Az is megállapítható, hogy a sejtproliferációhoz kapcsolódó biológiai funkciók kategóriák, mint például a sejtosztódás, a sejtciklus, az M fázissal (a sejtosztódás azon fázisa, melynek során lejátszódik a kromoszómák szegregációja, a sejtmag és a sejt kettéosztódása) kapcsolatos folyamatok, a sejtciklus fázis és a sejtciklus folyamat szignifikánsan felülreprezentáltak az EBA által elnyomott gének között (13.C. ábra, Klaszter2). Ezen EBA-gátolt gének további vizsgálatánál a GeneMANIA predikciós szerver segítségével

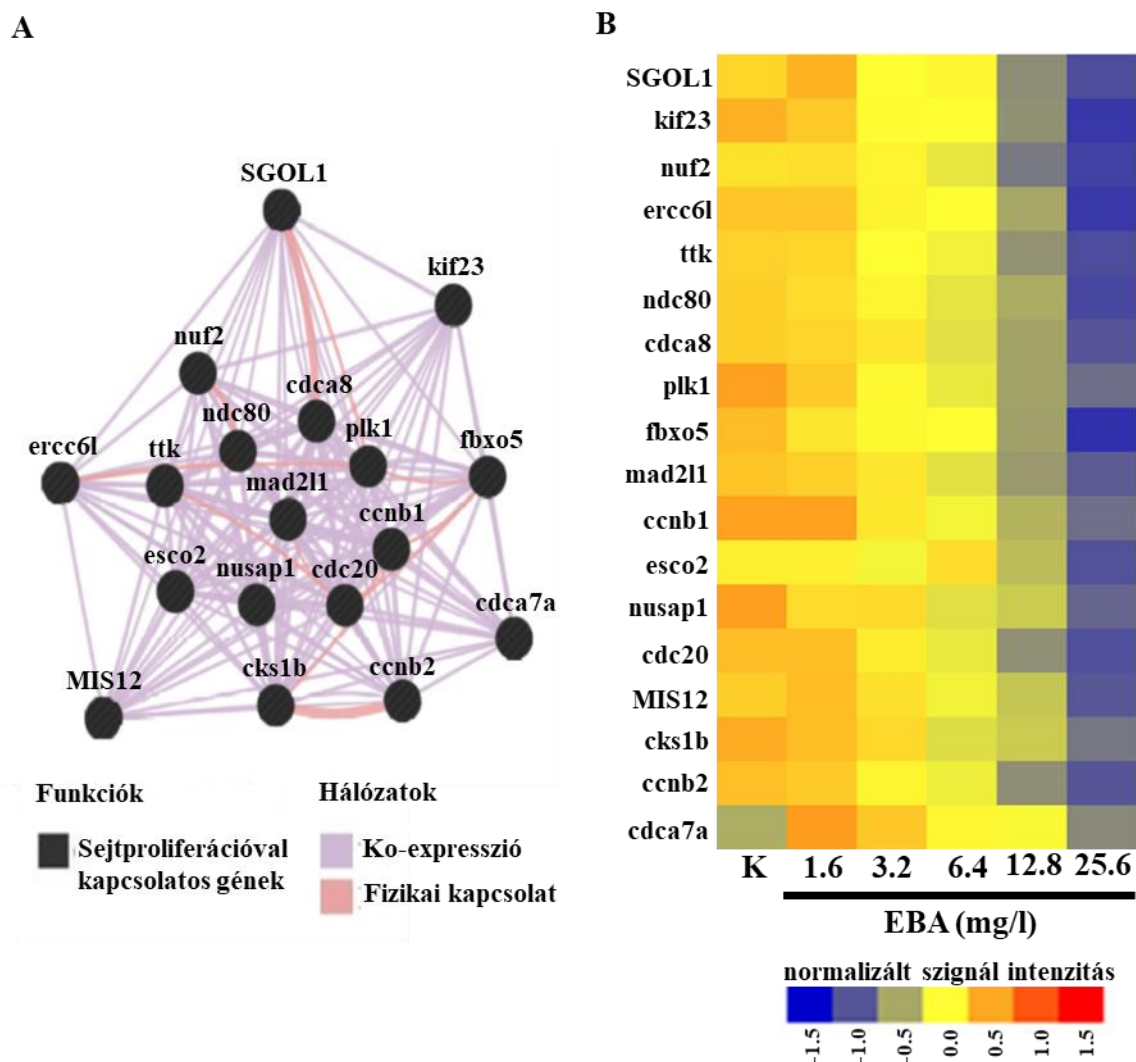
azonosítottam a 18-tagú sejtsztódáshoz kapcsolódó génhálózatot az együttes expresszió és a fizikai interakció alapján (14.A. és B. ábra).

Összefoglalva, a globális génexpressziós elemzés felvetette annak a lehetőségét, hogy az EBA-nak való kitettség indukálhatja a DNS károsodás és a gyulladáshoz kapcsolódó gének expresszióját, és gátolhatja a sejtproliferációhoz kapcsolódó géneket. Ezen feltevések igazolásának érdekében végeztem további kísérleteimet.



13. ábra Az EBA által indukált transzkripció változások 120 hpf zebradánió embriókban. (A) 120 hpf zebradánió lárvák mRNS transzkriptomjának két dimenziós főkomponens analízise, minden EBA által regulált mRNSre ( $p \leq 0,05$ ,  $FC \geq 2$ ). (B) Az EBA által szabályozott szabályozott génexpressziós klaszterek megjelenítése boksplot ábrán ( $p \leq 0,05$ ,  $FC \geq 2$ ) (C) Az EBA által leginkább befolyásolt 5 biológiai funkció klaszterenként.



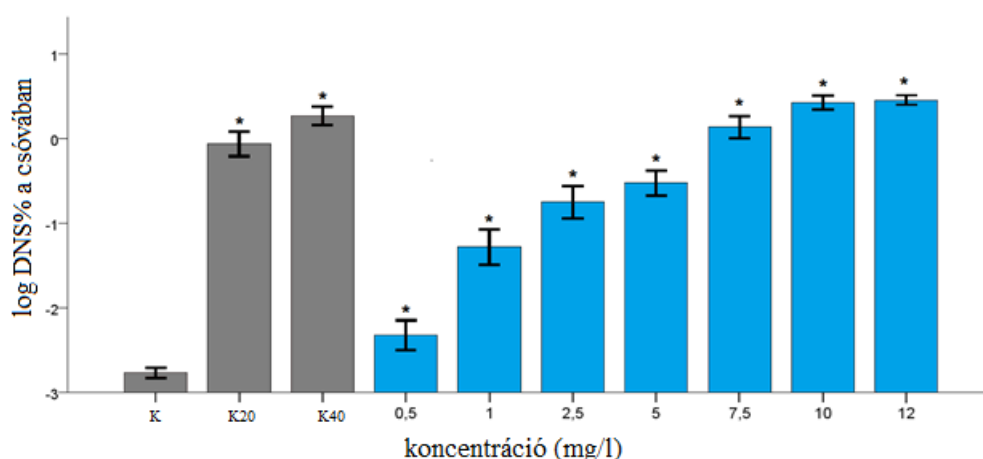


14. ábra A sejtproliferációval kapcsolatos génhálózat 120 hpf zebradánió embriókban. (A) A GeneMANIA-val azonosított csökkent expressziót mutató, sejtproliferációval kapcsolatos génhálózat (B) Hőtérkép, amely a sejtciklushoz kapcsolódó gének átlagos normalizált jelintenzitását mutatja a kontroll és az EBA-val kezelt 120 hpf zebradánió lárvákban

### 5.4. 1 dpf embriókon végzett comet assay vizsgálat

A microarray vizsgálat eredményei alapján megállapítható, hogy az EBA hatással van a DNS károsodással, javító mechanizmusokkal, illetve a sejtszintű stresszválasszal kapcsolatos gének működésére (14. ábra). Ennek az eredménynek a kísérletes bizonyítására alkalmaztam a comet assay módszert. Az embriókon kivitelezhető comet assay módszer korlátai miatt a vizsgálatot 0-24 hpf intervallumban kezelt embriókon végeztem az embrió tesztek alapján kiválasztott koncentrációkkal. A legmagasabb koncentráció 12 mg/l volt, mely kevesebb, mint fele a 24. órában meghatározott LC<sub>10</sub> értéknek, hiszen az anyag szubletális hatását szerettem volna tanulmányozni.

A kísérletben pozitív kontrollként használt szerves peroxid, a Luperox<sup>®</sup> minden esetben egyértelműen károsította a DNS-spirált a haltartó rendszer kontrollként használt vizéhez képest. A kezelt csoportok esetén már a legalacsonyabb, 0,5 mg/l-es koncentrációban szignifikánsan megnőtt a csóvában található DNS mennyisége a kontrollhoz képest ( $p < 0,05$ ) (15. ábra). Az is jól látható, hogy a DNS töredezettség mértékének emelkedése dóziszfüggő.



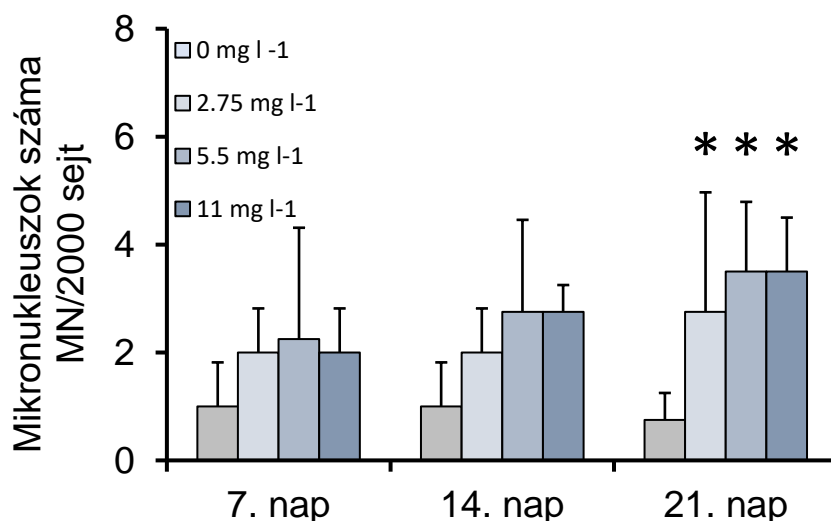
15. ábra EBA által indukált DNS károsodás 24 hpf zebradánió embrióon. A csillaggal jelölt csoportokban szignifikánsan magasabb volt a DNS töredezettség mértéke (Kruskal-Wallis teszt,  $H=978,714$ ,  $df=10$ ,  $p < 0,00001$ ) A K20 jelöli a 20 mg/l koncentrációval, K40 jelöli a 40 mg/l Luperox-szal kezelt pozitív kontroll csoportot.

### 5.5. Kifejlett halakon végzett mikronukleusz assay

Az EBA adult halakra gyakorolt DNS-károsító hatásáról ezidáig nem állt rendelkezésre információ és az embriókon kapott microarray és comet assay eredmények alapján feltételeztem, hogy ez a hatás a kifejlett egyedek esetén is fennáll. Ennek vizsgálatára alkalmaztam a mikronukleusz tesztet, melynek során Rácz és munkatársainak (2012) korábbi eredményeit használtam a koncentrációk beállításához. A három hétig tartó kísérlet során félstatikus

rendszerben tartott halakból vettem minden héten vérmintát és kutattam a mikronukleuszok megjelenése után.

A Poisson-regresszió kimutatta a mikronukleuszok kialakulási gyakoriságának szignifikáns növekedését a kontroll csoporthoz viszonyítva. Már az első héten megfigyelhető volt a mikronukleuszok számának növekedése, még a legalacsonyabb alkalmazott koncentráció esetén is. Azonban ez a különbség csak a harmadik hétre vált szignifikánssá ( $P < 0,05$ ). A kísérlet végére a 2,75 mg/l-es koncentráció esetében  $2,75 \pm 2,22$ , az 5,5 mg/l és a 11 mg/l-es koncentrációk esetén pedig  $3,5 \pm 1,29$ , valamint  $3,5 \pm 1,00$  mikronukleusz alakult ki (8. táblázat). Az egyes csoportok között nem volt statisztikailag kimutatható különbség, így megállapítható, hogy a kísérletben alkalmazott koncentrációk esetén a hatás nem volt koncentrációfüggő (16. ábra). Eredményeim alapján a módszer alkalmas alacsony koncentrációk esetén az EBA felnőtt halakra gyakorolt DNS-károsító hatásának kimutatására.



16. ábra Az EBA kezelés hatására kialakult mikronukleusz szám. A csillaggal jelölt csoportokban a kialakult mikronukleuszok száma szignifikánsan magasabb, mint a kontroll csoportban ( $p < 0,05$ )

8. táblázat EBA által indukált genomkárosodás miatt kialakult mikronukleusz szám meghatározásának eredményei. A kezelt csoportok és a kontroll közötti szignifikáns eltérést csillag jelzi (\*) ( $P < 0,05$ ).

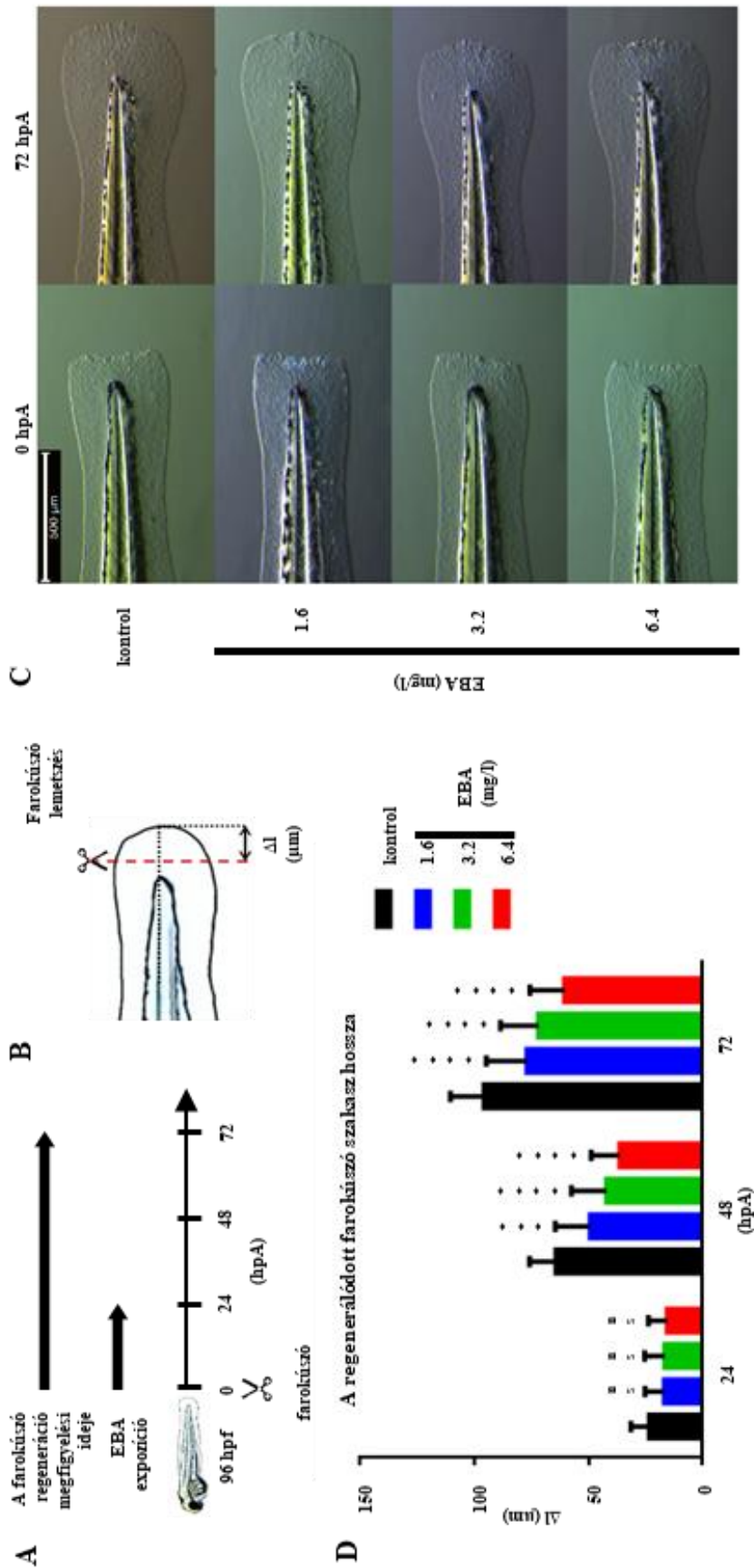
EBA (mg/L)	MN/2000 sejt		
	1. hét	2. hét	3. hét
0 mg/l	<b>1,00±0,82</b>	<b>1,00±0,82</b>	<b>0,75±0,50</b>
2.75 mg/l	<b>2,00±0,82</b>	<b>2,00±0,82</b>	<b>2,75±2,22*</b>
5.5 mg/l	<b>2,25±2,06</b>	<b>2,75±1,71</b>	<b>3,50±1,29*</b>
11 mg/l	<b>2,00±0,82</b>	<b>2,75±0,50</b>	<b>3,50±1,00*</b>

## 5.6. Regenerációs kapacitás vizsgálata

A microarray elemzése során fény derült rá, hogy az EBA hatására számos, a sejtosztódással és sejtciklussal kapcsolatos gén expressziója csökkent. Ebből arra következtettem, hogy csökkenhet a sejtosztódási aktivitás. Mivel a halak úszói gyorsan regenerálódnak, különösen igaz ez a fiatalabb életszakaszokra, ezért a microarray eredményeit egy egyszerű, farokregenerációs vizsgálattal kívántam alátámasztani.

A farokúszók végének altatásban történt lemetészése (17. A és B ábra) után a microarray vizsgálatban alkalmazott három legalacsonyabb koncentrációval kezeltem a halakat és mértem a farokregeneráció mértékét 24, 48 és 72 óra elteltével (17. C ábra).

A vizsgálat eredményeit az 17. D ábra szemlélteti. Jól látható, hogy 24 óra elteltével nem találtam statisztikailag igazolható különbséget a kezelt csoportok és a kontroll között. 48 óra elteltével minden kezelt csoportban szignifikánsan kisebb volt a regeneráció mértéke, mint a kontroll csoportban, továbbá a 6,4 mg/l-es csoport az 1,6 mg/l-es csoporthoz képest is szignifikánsan rövidebb volt a regenerálódott farokrész. A kezelés után 72 órával megismételt mérések is ugyanezt az eredményt hozták. Eredményeim alapján az EBA egyértelműen csökkenti a farokúszó regenerációs képességét, tehát valóban hatással van a sejtosztódással és sejtciklussal kapcsolatos folyamatokra.



17. ábra: Az EBA regenerációs képességre gyakorolt hatásának vizsgálata zebradánió farokúszó regenerációs kísérletben. (A) Az alkalmazott farokúszó lemetzéses módszer kivitelezésének sematikus ábrája (B) A farokúszó regeneráció kvantifikálásának sematikus ábrája (C) A regenerálódott farokúszó hossz ( $\Delta l$ ) az idő függvényében a metszés után (hpA) a kontroll csoportokban, valamint az EBA-val kezelt csoportokban ( $n \geq 30$ , átlag+szórás). \*\*\* $P < 0.001$ , \*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$ ; n.s. nem szignifikáns) (D): A farokúszókról készült fotók a metszés időpontjában és a kezelés 72. órájában.

## 6. Új tudományos eredmények

1. Az EBA esetén elsőként határoztam meg a pusztulás dózis-hatás összefüggéseit akut toxicitás tesztek segítségével. A 4-etilbenzaldehyd félhalálos koncentrációi zebradánió embriókra 95%-os konfidencia intervallum mellett: 24 hpf:  $31,45 \pm 0,82$  mg/l; 48hpf:  $30,85 \pm 0,89$  mg/l; 72hpf:  $27,52 \pm 1,5$  mg/l; 96hpf:  $22,00 \pm 1,39$  mg/l; 120hpf:  $18,44 \pm 1,91$  mg/l; valamint 96-120 hpf expozíciós ablakban:  $30,94 \pm 1,85$  mg/l.

2. A DFA esetén elsőként határoztam meg a pusztulás dózis-hatás összefüggéseit akut toxicitás tesztek segítségével. A 2-4-difluoroanilin félhalálos koncentrációi zebradánió embriókra 95%-os konfidencia intervallum mellett: 24 hpf:  $207,2 \pm 9,65$  mg/l; 48 hpf:  $196,5 \pm 11,2$  mg/l; 72 hpf:  $187,5 \pm 10,9$  mg/l; 96 hpf:  $180,2 \pm 9$  mg/l; 120 hpf:  $171,6 \pm 9,55$  mg/l.

3. Elsőként vizsgáltam a 4-etilbenzaldehyd génextpresszióra gyakorolt hatását halakon. Megállapítottam, hogy az EBA a DNS károsodással és javító mechanizmusokkal kapcsolatos biológiai funkcióval rendelkező gének expresszióját növeli, a sejtciklussal és sejtosztódással kapcsolatos génekét csökkenti, mindkét esetben dóziszfüggően. Az immunválasszal kapcsolatos gének expresszióját kizárólag a legmagasabb koncentrációban ( $25,6$  mg/l) növeli a kontrollhoz viszonyítva.

4. Kimutattam az EBA DNS-károsító hatását zebradánió embriókon akut kísérletben, comet assay módszerrel, valamint kifejlett egyedeken szubkrónikus kísérletben, mikronukleusz tesztet alkalmazva.

5. Először vizsgáltam az EBA regenerációs képességre gyakorolt hatását. A farokregenerációs kísérlet eredményei alapján az EBA még alacsony koncentrációban is egyértelműen csökkenti a szövetregeneráció sebességét, tehát hatással van a sejtosztódásra.

6. Az együttes expozíció és fizikai interakció alapján leírtam egy 18 génből álló, sejtproliferációval kapcsolatos génhálózatot, melynek tagjai az EBA hatására csökkent expressziót mutatnak.

## 7. Következtetések

### 7.1. Akut halembrió toxicitás tesztek eredményeiből levonható következtetések

Halembriókon végzett vizsgálataim során a DFA toxicitása alacsonynak bizonyult, 96 órás expozíció mellett az LC<sub>50</sub> érték 186 mg/l-nek adódott. Mivel mind az adult egyedekre vonatkozó (OECD TG 203), mind pedig az embriókra vonatkozó (OECD TG 236) akut toxicitás irányelvben szerepel az LC<sub>50</sub>=100 mg/l határérték, ha a limit tesztben kapott toxicitási határérték ennél magasabb, az anyag nem számít halakra nézve toxikusnak. Az anyag biztonsági adatlapján (CAS 367-25-9) kizárólag patkányra vonatkozó toxicitás értékek szerepelnek, orális alkalmazás esetén az LD<sub>50</sub> értéke 820 mg/ttkg, dermálisan 672 mg/ttkg, míg 4 órás inhalációval 6,21 mg/m<sup>3</sup>, tehát emlősökre nézve sem magas a toxicitása. Mivel a DFA-hoz tartozó, zebra-dánió embrión vizsgált LC<sub>50</sub> érték nem lelhető fel a tudományos irodalomban, ezért fontosnak tartottam annak meghatározását. Rajtam kívül korábban, az EBA-hoz hasonlóan, halmodellen Rácz és munkatársai (2012) vizsgálták a DFA hatásait. Meghatározták az akut LC<sub>50</sub> értéket kifejlett állatokon, az OECD 203-as számú irányelv alapján. Ez az érték 29,36 mg/l volt, ami valamivel magasabb, mint az EBA esetében. Az általam embriókon kapott eredmények alapján a DFA toxicitása egy nagyságrenddel kisebb embriókra nézve, mint Rácz és munkatársainak (2012) közleménye szerint kifejlett egyedekre. Ez több okra is visszavezethető, ilyen lehet az ikrahéj barrier hatása (Scholz et al. 2008), valamint az, hogy a zebra-dánió embriók kevésbé érzékenyek bizonyos, főként neurotoxikus anyagokra, mint a kifejlett egyedek (Bretaud et al. 2004, Domingues et al. 2010). Munkám során nem csupán az LC értékeket határoztam meg, hanem fenotípusos vizsgálatot is végeztem az embriókon. A DFA esetében megfigyeltem néhány általános, toxikus anyagok hatására kialakuló elváltozást az embriókon, mint a perikardiális ödéma és a szikanyag szürkés elszíneződése, a 100 mg/l fölötti koncentrációk esetében a halak gerince háti irányban meggörbült, ám ennek mértéke nem bizonyult koncentrációfüggőnek. A kísérleteim során a farok háti irányú görbületét figyeltem meg, mely hasonlóságot mutat a *heart and soul (has)* mutáns egyedek fenotípusával, mely az atipikus protein-kináz C (*aPKC*) gén mutációjára vezethető vissza. A *has* mutáns egyedekre jellemző a felfelé görbülő farokrész, az emésztőrendszerben, az idegrendszerben, valamint a szemekben megfigyelhető epiteliális rendellenességek, továbbá a szívburok megnagyobbodása. A mutáció hatással van az epiteliális szövetek kialakulására és bizonyos szervek fejlődésére, így közvetlenül összefüggésbe hozható a görbület kialakulásával (Peterson et al. 2001, Horne-Badovinac et al. 2001). A „*has-szerű*” fenotípus kialakulását megfigyelték ösztrogén hatású anyagok, mint például a zearalenon (Bakos 2014, Faisal et al. 2019) vagy a szójából származó genistein esetén is (Bakkiyanathan et al. 2010). Mint láthatjuk, a tünetek közül a DFA-val kezelt embriókon megfigyelhető a testgörbület, illetve a szívburok rendellenessége, így az *aPKC* gén

mutációjának vagy az esetleges ösztrogénszerű hatásának felderítéséhez további vizsgálatokra lesz szükség.

Vizsgálataim során meghatároztam az EBA zebradánió embriókra vonatkozó akut toxicitását is, illetve az EBA esetében is végeztem fenotípusos vizsgálatot, melynek során a DFA-hoz hasonlóan a zebradánióra jellemző általános tünetek, úgy, mint perikardiális ödéma, a szik szürkés elszíneződése, jelentkeztek. Ezeken a tüneteken kívül megfigyelhető volt a farok torzulása, illetve az úszószegélyek szélének szabálytalansága, ám egyik elváltozás sem bizonyult koncentrációfüggőnek.

Az LC<sub>50</sub> érték 96 órás expozíciós idő után 22,01 mg/l, míg az LC<sub>10</sub> érték 14,82 mg/l volt. Korábban az EBA-t gerinces modellen kizárólag Rácz és munkatársai (2012) vizsgálták. Kísérleteik során meghatározták az anyag kifejtett halakra vonatkozó LC értékeit, melyek az általam az embriókon kapott eredményekkel nagy hasonlóságot mutattak: 96 órás expozíció után az LC<sub>50</sub> értéke 23,49 mg/l, míg az LC<sub>10</sub> értéke 11 mg/l volt. Az EBA-val kapcsolatos tudományos irodalom nem csupán a gerinces modellek tekintetében hiányos, hiszen más toxikológiai modellszervezeten eddig nem vizsgálták a hatásait. Kizárólag *in vitro* vizsgálatok láttak napvilágot eddig, melyek során Rácz (2004) humán limfocitákon bizonyította az anyag genotoxikus hatását, hozzám hasonlóan comet assay segítségével, továbbá apoptózis serkentő hatását is igazolta.

Mint korábban leírtam, az EBA a legnagyobb mennyiségben előállított és fogyasztott fájdalomcsillapító és gyulladáscsökkentő hatóanyag, az ibuprofén bomlásterméke. Az anyamolekula helytelen hulladékkezelés következtében, valamint a kommunális szennyvizekkel természetes vizekbe is kikerül, és az ott élő vízi élőlények szervezetéből kimutatható (Brozinski et al. 2012). Buser és munkatársai (1999) szennyvíztisztítóba befolyó vízben 1 µg/l-t meghaladó mennyiségben mutatták ki a hatóanyagot, míg a kifolyási pontnál már csak ng/l nagyságrendben. Kozisek és munkatársai (2013) 23 cseh szennyvízkezelő telep elfolyóvizében kutattak gyógyszer hatóanyagok után és azt kapták, hogy a leggyakrabban előforduló hatóanyag az ibuprofén volt, melyet a 23 üzemből 19-ben sikerült kimutatniuk. Ebből arra lehet következtetni, hogy a szennyvíz kezelési módusok során az ibuprofén bomlása intenzív, így nem csupán az anyamolekula, hanem bomlástermékeinek vizsgálata is indokolt.

Az emlős modellen végzett első átfogó toxikológiai vizsgálatok Adamshez és munkatársaihoz köthetők (1969). Érdekesség, hogy a vizsgálatok megjelenésének évében, 1969-ben került először klinikai alkalmazásra a hatóanyag, elsősorban a reumatoid arthritisz kezelésére. Egéren, patkányon és kutyán vizsgálták az anyag hatásait egyszeri adagolás mellett, majd patkányon és kutyán ismételt dózissal. A hatóanyag teratogenitását is tesztelték patkányon, nyúlra és kutyán is. Az akut LC<sub>50</sub> értékek egér esetén a bejuttatás módjától függően 320 mg/kg (intraperitoneális) és 800 mg/kg (orális) között, patkány esetén 1600 mg/kg (orális) és 1300 mg/kg



(szubkután). A kutyák esetén 125 mg/kg már hányást, véres székletet és a gyomor és béltraktus nyálkahártyájának sérülését okozta; 20 mg/kg és 50 mg/kg dózis esetén ezek a tünetek nem voltak megfigyelhetők. Az akut tünetek patkány és egér esetében a szedáció és a levertség mellett a nehézlégzés és emésztőrendszeri fekélyek kialakulása volt. Ezen fekélyek kialakulása mind orális, mind pedig más bejuttatási módok esetén megfigyelhető volt, így az anyag nem csupán lokálisan okoz fekélyesedést, de szisztémásan is (Adams et al. 1969).

Toxicitása nem csupán az emlős modellek esetén eltérő, különböző halfajokon végzett vizsgálatokban is nagyságrendi különbségek mutatkoznak a toxicitás értékekben. Az ECHA (*European Chemicals Agency* – Európai Vegyianyag Ügynökség) adatbázisa szerint a naphalon (*Lepomis macrochirus*) az  $LC_{50\ 96h}$  értéke 173 mg/l, mrigal (*Cirrhinus mrigala*) esetén az  $LC_{50\ 24h}$  értéke 142 mg/l (Saravanan et al. 2012), medaka esetén pedig az  $LC_{50\ 96h}$  értéke >100 mg/l. Zebradánió embrió esetén az  $LC_{50\ 48h}$  értéke 23,9 mg/l, mely nagyon közel áll az általam az EBA esetén megállapított 30,85 mg/l értékhez.

Az 1969-ben publikált (Adams et al. 1969) tanulmány leírt teratogenitás vizsgálatok eredményeiből az derül ki, hogy sem patkányok, sem pedig nyulak esetén sem az alom létszámra, sem az alomtömegre nem volt hatással és a kis számban előforduló torzulások sem voltak dóziszfüggők, így nem bizonyult teratogénnek. A kétezres években aztán fény derült rá, hogy az ibuprofén mind patkányok, mind nyulak esetében a méhen belüli növekedés csökkenését, a kamrai szeptum rendellenes fejlődését és celoszómiát, azaz a zsigerek testüregen kívüli fejlődését okozhatja (Cook et al. 2003; Cappon et al. 2003, 2005; Burdan et al. 2005, 2006; Ofori et al. 2006).

David és munkatársai (2009) szintén zebradánión vizsgálták az EBA anyamolekulájának, az ibuprofénnek az embriófejlődésre gyakorolt hatásait és hozzám hasonlóan perikardiális ödéma kialakulását és a szik elszíneződését tapasztalták. Az úszószegélyek torzulása az ibuprofén esetén nem volt megfigyelhető, ám a mellúszó torzulása, magasabb koncentrációk (10-100  $\mu\text{g/l}$ ) esetén hiánya, igen. Mind a perikardiális ödéma, mind pedig az úszók fejlődési rendellenességei az ibuprofén ciklooxygenáz enzimekre gyakorolt gátló hatására vezethető vissza. Mint nem szelektív ciklooxygenáz inhibitor, ciklooxygenáz enzimek (COX-1, COX-2) gátlásán keresztül gátolja a prosztanoidok termelődését, ez a folyamat jelentős genetikai és funkcionális hasonlóságot mutat az emlősökkel (Grosser et al. 2002; Prescott & Yost 2002). A zebradánió fejlődése szempontjából a prosztanoidok közül a proszttaglandinok szükségesek a testszelvények kialakulásához. Hiányában a szelvények közötti erek megrövidülnek, szív és úszó fejlődési rendellenességek alakulnak ki (Cha et al. 2005, 2006). Patkányok esetén a ciklooxygenáz inhibitorok a magzatok fejlődésének visszamaradását eredményezik (Burdan et al. 2005, 2006).

Az EBA szerkezetében és fiziko-kémiai tulajdonságaiban is nagyon hasonló, az élelmiszeriparban mesterséges mandula olajként ismert benzaldehidhez, mely a mesterséges

vanília aroma után a második legnagyobb mennyiségben felhasznált illatanyag (Krings & Berger 1998). Halmodellen McKim és munkatársai (1987) vizsgálták, kísérleteikben 100 grammos testtömegű szivárványos pisztrángokat használtak, az  $LC_{50\ 96h}$  értéke 12,69 mg/l volt, a termék biztonsági adatlapján (CAS 100-52-7) szintén a szivárványos pisztrángra vonatkozóan 11 mg/l szerepel. Zebradánióra vonatkozó toxicitás értéket nem leltem fel a szakirodalomban, ám naphalon (*Lepomis machrochirus*) az  $LC_{50\ 96h}$  értéke 1,1 mg/l, szintén a biztonsági adatlap alapján. A zebradánióhoz hasonlóan a Pontyfélék családjába tartozó, kisméretű modell fajon, az Észak-Amerikában honos *fathead minnow*-n (*Pimephales promelas*), átfolyó rendszerben, 72 órás expozíciós idő alkalmazása mellett a toxicitás értéke  $LC_{50}=7,6$  mg/l (Walker et al. 2003). A biztonsági adatlap szerint az anyag emlősökre nézve kevésbé toxikus, patkány, nyúl és tengerimalac esetén is meghaladja az  $LD_{50}$  értéke az 1000 mg/ttkg-ot, egér esetén ez 28 mg/ttkg, ám még így sem számít kifejezetten toxikusnak. Emlős modellszervezetek – hörcsög, nyúl, egér – esetén késlelteti az embriók fejlődését és csökkenti a magzati és újszülöttkori testtömeget, de kizárólag azokban a koncentrációkban, melyek a szülőkre nézve is toxikusak (WHO 1996). A benzaldehid csirke embriókban teratogén hatású, a csontváz és a végtagok koncentrációfüggő torzulását okozza (Abramovici & Rachmuth-Roizman 1983).

A WHO (2002) állásfoglalása szerint a benzaldehid elfogadható napi beviteli mennyisége 5 mg/ttkg, míg becsült bevitele Európában 9,3 mg/fő/nap, az Amerikai Egyesült Államokban 36 mg/fő/nap. Láthatjuk tehát, hogy még a magasabb amerikai beviteli mennyiség is sokkal a javasolt ADI érték alatt van, így az anyag fogyasztókra gyakorolt káros, akut hatásától nem kell tartani, bár krónikus hatásai potenciális veszélyt jelenthetnek.

Az anyag teratogén hatásairól nem találtam releváns információt a tudományos szakirodalomban, így nem áll módomban összehasonlítani az általam az EBA vizsgálata során kapott eredményekkel. Az általam zebradánión megfigyelt fejlődési rendellenességek, mint a sziködéma, perikardiális ödéma, a szik szürkés elszíneződése, a farok és úszószegélyek rendellenes fejlődése, visszavezethetők a benzaldehid sejten belüli metabolizmusa során végbemenő káros folyamatokra, melyeket a következő fejezetben ismertetek.

## **7.2. A transzkriptom analízis és annak eredményét igazoló vizsgálatokból levonható következtetések**

Az EBA esetében lehetőségem nyílt DNS microarray készítésére, melynek segítségével az anyag hatására kialakuló génexpressziós változásokat vizsgáltam. Kísérleteimhez Agilent SurePrint G3 Custom GE 8x60k (Amadid G4102A, Agilent Technologies, USA) arrayt használtam, mely egy kereskedelmi forgalomban kapható, az egész zebradánió genomot

reprezentáló oligonukleotid array. A vizsgálatokat a 96-120 hpf időablakban végeztem, mert 96 órás korára az embrió átesik a fejlődés legintenzívebb részén, kifejlődnek az emésztőrendszer részei (Strähle et al. 2012). A hormonszintézis és a nukleáris receptorok ebben az időben kezdenek el kialakulni, ezért ebben az életszakaszban már a hormonális hatásokra is érzékenyebbek az embriók (Fetter et al. 2015). Ennek köszönhetően ismeretlen hatású anyagok vizsgálatakor érdemes kiemelt figyelmet fordítani erre az életszakaszra. Korábban Fetter és munkatársai (2015) sikerrel alkalmazták ezt az életszakaszt és array típust zebradánió embriókon, androgén-reszponzív gének azonosítására.

DAVID biológiai funkcióelemzés segítségével a Klaszter 1-ben számos stresszel és DNS-károsodással összefüggő biológiai funkciókategóriát azonosítottam, ideértve a sejtek stresszreakcióját, a sugárzásra adott reakciót, a DNS helyreállítását és a DNS-károsító stimulusra adott választ (14.C. ábra Klaszter 1). A génexpressziós elemzés eredményéből látható, hogy az EBA-nak való kitettség koncentrációfüggő módon indukálja a DNS károsodással és javító mechanizmusokkal, valamint a sejszintű stresszválasszal kapcsolatos gének expresszióját. Ebből arra következtettem, hogy az EBA potenciális DNS-károsító hatással rendelkezik, hiszen nő a javító folyamatok aktivitása. Mivel a microarray vizsgálatot embriókon végeztem, esetükben a feltételezésem igazolására comet assay-t használtam. Ezt a vizsgálati módszert széles körben alkalmazzák a különböző víztisztítási melléktermék vegyületek DNS-károsító hatásának vizsgálatára halakból (Buschini et al. 2004), kagylókból (Bolognesi et al. 2004), humán sejtenyészetekből (Muller-Pillet et al. 2000, Plewa et al. 2002) vagy akár rendszeresen uszodai medencét használó emberekből (Kogevinas et al. 2010) származó minták esetén. Mivel az irodalomban nem állnak rendelkezésre információk, a kezelési koncentrációk megválasztásakor a saját akut toxicitás vizsgálatomban kapott értékeket vettem alapul ( $LC_{50\ 96h}=22,01$  mg/l,  $LC_{10\ 96h}=14,82$  mg/l,  $LC_{50\ 96-120h}=30,94$  mg/l,  $LC_{10\ 96-120h}=25,59$  mg/l). Az EBA kezelés hatására koncentrációfüggő mértékben nőtt a DNS-töredezettség mértéke (16. ábra), tehát ezzel az egyszerű módszerrel sikerült igazolni, hogy az EBA zebradánió embriók esetén valóban káros hatással van az örökítőanyagra, a javító mechanizmusokkal kapcsolatos gének expressziója nő, ám ez sem elég az anyag káros hatásainak kompenzálására.

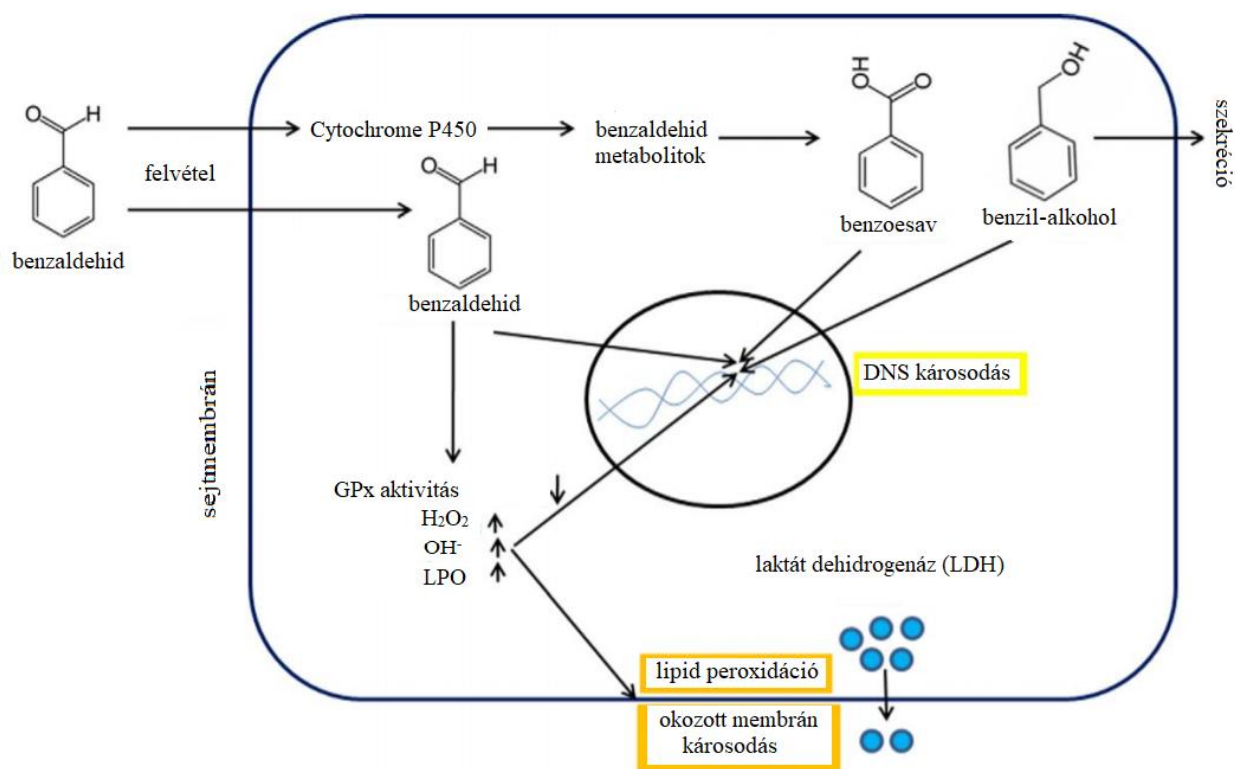
Kifejlett egyedek esetében is megvizsgáltam az anyag feltételezett DNS-károsító hatását, hiszen erről sem találtam információt a szakirodalomban. Kísérletemben a Rácz és munkatársai (2012) kifejlett egyedekre, 96 órás kitettség esetén számolt  $LC_{10}$  értéket vettem alapul (11 mg/l). A kísérlet 21. napjára statisztikailag igazolható módon nőtt a mikronukleuszok száma a kezelt csoportokban. Ebből arra következtetek, hogy kifejlett egyedek esetén is DNS-károsító hatása van az EBA-nak, ám az alacsonyabb kezelési koncentráció miatt több hetes expozíció szükséges annak kialakulásához. Az EBA anyamolekulája, az ibuprofén is rendelkezik DNS-károsító hatással.

Rocco és munkatársai (2010) szintén kifejtett zebradánió egyedeken végezték vizsgálatukat, melynek során a kísérleti állatokat 28 napon keresztül kezelték az ibuprofén Olaszországra jellemző, releváns környezeti koncentrációjával (92 ng/l). Vizsgálataik során comet assay-t alkalmaztak, melynek során kifejtett halakból származó vérmintákat használtak fel. A kísérlet során az első mintavétel az 5., a második a 7. napon történt, majd ezt követően 7 naponta. Azt tapasztalták, hogy a DNS-károsodás mértéke az 5. és 28. napon történt mintavétel alkalmával volt csak statisztikailag igazolhatóan nagyobb mértékű, mint a kontroll csoport esetén. Ennek okát abban látják, hogy a DNS javító mechanizmusok előtérbe kerülésével a halak szervezete kompenzálni tudta a károsító hatást, ám a tartós kitétség miatt a javító folyamatok már nem voltak képesek ellensúlyozni az ibuprofén DNS-integritásra gyakorolt káros hatását. Egy melegvízi halfaj, nílusi tilápia (*Oreochromis niloticus*) egyedének akut (48 h) és szubkrónikus (10 nap) 300 ng/l koncentrációval történt kezelése után mikronukleusz teszt segítségével szintén igazolták az örökítőanyag károsodását (Ragunetti et al. 2011). A halak mellett más, környezettoxikológiai szempontból fontos modellszervezeteken is kimutatták DNS-károsító hatását, például a nagy vízibolhán (*Daphnia magna*) (Gómez-Oliván et al. 2014), valamint zebrakagylón (*Dreissena polymorpha*) (Parolini et al. 2011). A hatóanyag azonban nem csak az alsóbb rendű élőlények örökítőanyagára van hatással. Roodbari és munkatársai (2015) eredményei alapján az ibuprofén káros hatással van az egerek sperma minőségére, valamint növeli a DNS fragmentáció mértékét a spermiumokban.

Az EBA-hoz fiziko-kémiai tulajdonságaiban leginkább hasonló benzaldehid örökítőanyagot károsító hatását is igazolták már humán limfocitákon comet assay, míg ecetmuslicákon (*Drosophila melanogaster*) SMART teszt alkalmazásával (Demir et al. 2008, 2010). 1600 µg/ml koncentrációban CHO (*chinese hamster ovary*- kínai hörcsög petefészek) sejteken, 2 mM koncentrációban pedig humán limfocitákon kromoszóma aberrációt és testvérkromatida kicserélődést okozott (Galloway et al. 1985, Jansson et al. 1988). Több kutatásban kimutatták, hogy a benzaldehid kis mértékben toxikusabb a humán tumor sejtvonalakra (HL-60, ML-1, KG-1, HSC-2, HSC-3, HSC-4, T98G, U87MG), mint a normál sejtekre (Liu et al. 2008). A benzaldehid DNS-károsító hatásának hátterében sejten belüli metabolizációja áll, melyet a 18. ábra mutat be. Jól látszik, hogy a sejtmembránon történő bejutást követően aktiválja a citokróm P450 rendszert, mely benzoesavvá és benzil-alkohollá alakítja, mely szekréció során távozik a sejtől (Tabatabaie & Floyd 1996). A transzformáción át nem esett benzaldehid molekulák, illetve az azokból képződött benzoesav közvetlenül képes károsítani a DNS-t, továbbá a benzaldehid csökkenti a glutation-peroxidáz enzimek (GPx) aktivitását, azáltal nő az oxidatív stressz és a lipidperoxidáció mértéke (Ulker et al. 2012). Előbbi gyulladáshoz vezető folyamatokat,

valamint nagyobb mértékű oxidatív stressz esetén apoptózist indukálhat, míg utóbbi a sejtmembránok károsodását (Gloire et al. 2006).

A biológiai folyamatlemezés azt is kimutatta, hogy a nagy dózisu (25,6 mg/l) EBA-expozíció indukálhatja az immunrendszer működésével, a szerves és szervetlen anyagokra adott sejtszintű válaszokkal, illetve az aminosav származékok sejtben belüli metabolizmusával kapcsolatos gének expresszióját (14.C. ábra Klaszter 3). A már ismertetett irodalmi adatok mellett mind az EBA által kiváltott DNS-károsodás és az ehhez kapcsolódó gének expressziójának növekedése, mind pedig a Klaszter 3 biológiai funkciói és expresszió növekedése arra enged következtetni, hogy az EBA sejtben belüli metabolizációja és hatása a sejtek működésére nagy hasonlóságot mutat a benzaldehiddel, és ez az összetett mechanizmus áll a tapasztalt elváltozások hátterében.



18. ábra A benzaldehid metabolizációja és hatása a sejtanyagcserére (Ulker et al. 2012 alapján)

Az ibuprofén, amellett, hogy nem szelektív ciklooxygenáz inhibitor, zebradánió halfajon vizsgálva serkentő hatással van az antioxidáns enzimek közül a glutation peroxidázra (GPx) és a glutation-S-transzferázra (GST). Ez magyarázható azzal, hogy a sejtekben az ibuprofén hatására oxidatív stressz alakul ki, így az erre adott válaszként nő ezen enzimek aktivitása. A glutation reduktáz (GR) és kataláz (CAT) enzimekre azonban nincs hatással, valamint a kezelt csoportokban a lipidperoxidációs folyamatokat jelző malondialdehid szintje is alacsonyabbnak bizonyult, mint

a kontroll csoportokban. Az ibuprofén zebradánión, tehát a benzaldehiddel ellentétben, nem indukál oxidatív stresszt, sőt szerepe van a lipidperoxidáció megelőzésében (Bartoskova et al. 2013). Az általam vizsgált EBA hatásmechanizmusát tekintve tehát közelebb áll a hozzá kémiai szerkezetében, fiziko-kémiai tulajdonságaiban leginkább hasonló benzaldehydhez, mint az anyamolekulához, az ibuprofénhez.

Az is megállapítható, hogy a sejtproliferációhoz kapcsolódó biológiai funkciók kategóriák, mint például a sejtosztódás, a sejtciklus, a sejtosztódás M fázisa, a sejtciklus fázis és a sejtciklus folyamat szignifikánsan felülreprezentáltak az EBA által elnyomott gének között (14.C. ábra Klaszter 2). A klaszterbe tartozó EBA-gátolt gének további vizsgálatánál a GeneMANIA predikciós szerver segítségével azonosítottam a 18-tagú sejtosztódáshoz kapcsolódó génhálózatot, az együttes expresszió és a fizikai interakció alapján (15.A. és B. ábra). Az UniProt és ZFIN adatbázisokban megtalálható információk alapján elmondható, hogy mind a 18 gén kulcs szerepet játszik a sejtosztódásban, többségük az osztódáshoz szükséges elemek kialakításában (*ercc6l*, *mis12*, *esco2*, *nusap1*, *ndc80*, *nuf2*, *sgoll*, *plk1*, *kif23*), míg bizonyos gének főként az osztódási folyamatok szabályozásában (*ttk*, *cks1b*, *mad21l*, *cdca8*, *ccnb1*, *ccnb2*, *cdc20*, *cdca7a*, *fbxo5*). A *cdca7a* gén a zebradánióra jellemző, szerepe van a vérképző őssejtek és a thymus fejlődésében. Humán ortológja a *cdca7*, melynek túlexpressziója növeli az emlőrák valószínűségét és rontja a betegek gyógyulási esélyeit (Ye et al. 2018). Chetaille és munkatársai (2014) leírták, hogy a *sgoll* gén mutációja embereknél a CAID-szindróma (*chronic atrial and intestinal dysrhythmia* – krónikus pitvari és intesztinális diszritmia) kiváltó oka, vizsgálataik során zebradániókban morpholino oligonukleotid segítségével kiütötték a *sgoll* gént és a kísérleti állatok az embereken is tapasztalható tüneteket mutatták. Tehát ha külső hatások által csökken ennek a génnek az expressziója, az káros lehet a szív megfelelő működésére, ám ennek igazolására további vizsgálatok szükségesek. Az általam leírt génhálózat két tagja, az *esco2* és a *ttk* részt vesznek a farokúszó regenerációjában (Banerji et al. 2016, Grotek et al. 2013), továbbá a *mad21l*, *fbxo5*, *kif23* gének is expresszálnak a proliferatív területeken (Thisse et al. 2001), így ezek expresszió csökkenéséből arra következtettem, hogy az EBA negatív hatással van a regenerációs folyamatokra. Feltételezésem igazolására farokregenerációs vizsgálatot végeztem 96 hpf korú embriókon, melynek során megállapítottam, hogy következtetésem helyes volt, hiszen a kezelt csoportokban szignifikánsan csökkent a regeneráció mértéke (18. ábra). A benzaldehyd esetén HeLa és NHIK 3025 humán sejtvonalakon *in vitro* kimutatták sejtproliferációt csökkentő hatását, mely koncentrációfüggőnek bizonyult (Nambata et al. 1981; Pettersen et al. 1983). Ulker és munkatársai (2012) TUNEL assay és WST-1 sejtproliferációs assay módszerekkel vizsgálták az anyag hatásait humán limfocita sejteken és kimutatták, hogy már az anyag alacsonyabb koncentrációi (10, 25, 50 µg/ml) is képesek genotoxikus és citotoxikus hatást kifejteni *in vitro*.

Ibuprofén esetén *Hydra attenuata* hidra fajon kimutatták, hogy csökkenti a regenerációs képességet (Quinn et al. 2008).

Az EBA az egyik legnagyobb mennyiségben előállított gyógyszer hatóanyag, az ibuprofén bomlásterméke (Madhavan et al. 2010), mely hőközlés és oxidációs folyamatok hatására képződik, tehát a vízkezelési technológiák alkalmazásával ideális feltételeket biztosítunk a kialakulásához. A rendelkezésre álló minimális toxikológiai eredmény ellenére az élelmiszeriparban íz- és illatanyagként használható és az EFSA sem tartja veszélyesnek, pedig igazolhatóan megtalálható az ivóvízben (Li et al. 2017) - a fogyasztók krónikus kitettsége egyértelmű veszélyt rejt magában.

Az EBA példájából kiindulva számtalan olyan vegyület lehet a környezetünkben, mely hétköznapi tisztálkodási szereink vagy gyógyszereink bomlása során alakul ki, és hatásai az tudomány számára ismeretlenek. A DBP-kel kapcsolatos szabályozás az ebbe a csoportba tartozó vegyületek magas számához (több, mint 600 ilyen vegyületet ismerünk) képest nem szigorú, hiszen a WHO irányelvekben 15, az US EPA szabályozásában 4 vegyület vagy vegyületcsoport került szabályozásra, az EU-ban pedig csak az összes THM vegyületre és a bromát mennyiségére állapítottak meg határértéket. Sok olyan vegyületcsoport van, mely a szakirodalom szerint szabályzás alá nem eső kategóriába, vagy a szennyezőkből kialakult melléktermékek kategóriájába sorolható, ahová az EBA és a DFA is tartozik. Az ismert DBP-k humán egészségügyi veszélyeire, úgy, mint rákkeltő hatás (Hrudley et al. 2009), reprodukív kockázat (Waller et al. 1998), citotoxicitás (Landi et al. 1999) és mutagenitás (Richardson et al. 2007) már fény derült, viszont a szabályozás alá nem eső és még ismeretlen vegyületek veszélyt jelenthetnek a népességre.

A szennyezőkből kialakult, kevésbé ismert vegyületek közé tartozik az általam vizsgált EBA is, melyet jellegzetes keserűmandula illata miatt az élelmiszeripar és a kozmetikai ipar is alkalmaz, mint íz- és illatanyagot, annak ellenére, hogy toxikológiai vonatkozásairól rendkívül kevés információ áll rendelkezésre. Természetes módon előfordul bizonyos zöldségekben (Lonchamp et al. 2009; Barra et al. 2007) és állati eredetű termékekben (Triqui&Reineccius 1995; Silva et al. 2012), mint illatkomponens, így számos forrásból bekerülhet a fogyasztók szervezetébe.

Ezeket a tényeket figyelembe véve, eredményeim alapján elmondható, hogy nagyobb figyelmet kell fordítani mind a víztisztítási melléktermék vegyületek, mind pedig az élelmiszerekbe bekerülő anyagok részletes toxikológiai vizsgálatára, mert komoly veszélyeket jelenthetnek mind a fogyasztókra, mind pedig a környezetre.

### 7.3. Javaslatok

- Az EBA példájából jól látszik, hogy a kevés rendelkezésre álló adat ellenére forgalomba kerülhetnek bizonyos vegyületek, melyek ártalmasak lehetnek az emberi egészségre és a környezetre, ezért javaslom további vizsgálatát más tesztszervezeteken, valamint további víztisztítási melléktermékvegyületek és élelmiszeripari adalékanyagok komplex toxikológiai vizsgálatát akut, szubkrónikus és krónikus vizsgálatokban.
- Mivel a 72 hpf embriók farka háti irányban elgörbült minden 100 mg/l feletti kezelési koncentráció esetén, így felmerült annak a lehetősége, hogy a DFA ösztrogénszerű hatással rendelkezik, hiszen ezt a rendellenességet már más szerzők is leírták bizonyítottan ösztrogénhatású anyagok esetén (Bakos 2014, Bakkiyanathan et al. 2010). A fark görbülete hasonlóságot mutat a *heart and soul (has)* mutáns egyedek fenotípusával, mely az atipikus protein-kináz C (aPKC) gén mutációjára vezethető vissza. Az aPKC gén mutációjának vizsgálatára specifikus morpholino oligonukleotid alkalmazását javaslom. Az anyag esetleges ösztrogénszerű hatásainak vizsgálatára pedig alkalmas lehet a Bakos és munkatársai (2019) által létrehozott ösztrogén érzékeny, májtranszgenikus zebradánio vonal a *Tg(vtg1:mCherry)*.
- A microarray vizsgálatom alapján, melyből kiderült, hogy az EBA potenciális DNS-károsító hatással rendelkezik, hiszen számos, DNS-javító mechanizmusokkal kapcsolatos gén expresszióját növeli. Továbbá számos sejtosztódással kapcsolatos gén expresszióját csökkenti, mely arra enged következtetni, hogy negatívan befolyásolja sejtosztódást, ezáltal a regenerációs képességet. Ezeket a feltevéseket klasszikus módszerekkel (comet assay, mikronukleusz assay és farkregenerációs vizsgálat) sikerült alátámasztani, ám a folyamatok behatóbb tanulmányozására a FISH-comet assay-t javaslom, mely a comet assay és a fluoreszcens *in situ* hibridizáció kombinációja, így pontosabb képet kaphatunk az anyag hatásáról és az egyes gének kifejeződéséről.
- A szakirodalmi adatok alapján az EBA sejtszintű hatásmechanizmusa feltételezhetően hasonlít a benzaldehydére, így hatással lehet a GPx és GST antioxidáns enzimekre. Javaslom az EBA oxidatív stresszre gyakorolt hatásának vizsgálatát.



## 8. Összefoglalás

Az ipari fejlődés és a modern életvitel következtében számtalan vegyi anyag kerül ki a környezetbe, ezáltal ivóvízbázisainkba is. Ezek az anyagok reakcióba léphetnek egymással, valamint a nyersvizekben megtalálható szervesanyaggal is, kiváltképp, ha az ivóvíz előállítás során ezeket a vízforrásokat erős oxidálószernek, ózonnak vagy UV-sugárzásnak tesszük ki. Az urbanizálódott területeken, így Budapest környékén, Európa egyik legnagyobb, iparilag is jelentős városokon áthaladó folyójában, a Dunában is jelen van számos, kommunális eredetű szennyező. A dolgozat előzményeként szolgáló kutatásokban Duna-menti, parti szűrésű kutakból származó ivóvizet vizsgáltak, és tárták fel annak genotoxikus hatását baktériumokra nézve (Sujbert et al. 1993) és apoptotikus aktivitást növelő (Rácz et al. 2004) hatását sejtenyészeten vizsgálva.

Vizsgálataim során két víztisztítási melléktermék vegyület, a 2,4-difluoroanilin (DFA), valamint a 4-etilbenzaldehyd (EBA) hatásait vizsgáltam zebradánió tesztszervezeten. Az EBA az egyik leggyakrabban alkalmazott fájdalomcsillapító, az ibuprofén bomlástermékeként alakulhat ki a víz kezelése során, emellett az élelmiszeripar íz- és illatanyagként alkalmazza, aldehidekre jellemző mandula illata miatt. Vizsgálataimban főként ennek az anyagnak a vizsgálatára koncentráltam, mert az irodalomban nagyon kevés információ áll rendelkezésre az anyag hatásaival kapcsolatban, annak ellenére, hogy potenciális veszélyt jelenthet a vízi ökoszisztémákra, és akár az emberek egészségére is.

Mivel az eddig megjelent tudományos közleményekben nem találtam erre vonatkozó információkat, első lépésként meghatároztam az anyagok zebradánió embriókra vonatkozó LC-értékeit halembrió akut toxicitási teszt (OECD 236) segítségével, 0-120 hpf expozíciós idő mellett. Továbbá a microarray vizsgálat kivitelezéséhez meghatároztam az LC-értékeket a 96-120 hpf expozíciós ablakban, mert az embriók ekkorra már átesnek a fejlődés legintenzívebb részén (Strähle et al. 2012), valamint ebben az életszakaszban már a hormonális hatásokra is érzékenyebbek az embriók (Fetter et al. 2015). Leírtam a vegyületek által okozott fejlődési rendellenességeket a 72 hpf embriókon, valamint az EBA esetén a 96-120 hpf expozíciós ablakban kezelve is.

Kísérleteimet az EBA részletesebb vizsgálatával folytattam. Első lépésként microarray assay-t végeztem az anyag génműködésre gyakorolt hatásainak feltérképezése érdekében. A transzkriptom analízis során kiderült, hogy három klaszterbe sorolhatók azok a gének, melyeknek expressziója koncentrációfüggő módon változik az EBA hatására. A Klaszter 1-be sorolhatók azok a gének, melyek a biológiai funkció elemzés szerint a DNS-károsító hatásokkal, DNS-javító mechanizmusokkal, sejtszintű stresszválasszal kapcsolatosak. A klaszter génjeinek expressziója nőtt a kezelési koncentrációk emelkedésével, ebből arra következtettem, hogy az anyag DNS-károsító hatással rendelkezik. Ennek a feltevésnek az igazolására comet assay módszert

alkalmaztam, mellyel sikerült bizonyítanom az EBA DNS-károsító hatását. Kifejlett egyedeken mikronukleusz assay segítségével, szubkrónikus kezelésben (21 nap) vizsgáltam ezt a hatást és igazoltam, hogy az EBA növeli a DNS-töredezettség mértékét kifejlett zebradániókban. A Klaszter 2-be sorolható gének sejtosztódással és sejtciklus folyamatokkal kapcsolatos biológiai funkciókkal rendelkeznek, expozíciójuk a kezelési koncentráció emelkedésével csökken. Ebből arra következtettem, hogy az anyag negatív hatással van a sejtosztódásra, ezáltal a regenerációra. Farokregenerációs vizsgálattal bebizonyítottam, hogy az EBA csökkenti a zebradánió embriók regenerációs kapacitását, tehát negatív hatással van a sejtosztódási folyamatokra. Továbbá GeneMANIA predikciós szerver segítségével azonosítottam egy 18-tagú génhálózatot az együttes expresszió és fizikai interakció alapján. A Klaszter 3-ba sorolható gének expressziója csak a legmagasabb koncentrációval kezelt csoport esetében növekedett a kontrollhoz képest, biológiai funkcióelemzés alapján főként a környezeti stresszorokra adott válaszokkal hozhatók összefüggésbe, ezen génekkel kapcsolatban további vizsgálatok szükségesek.

Eredményeim alapján elmondható, hogy a víztisztítási melléktermék vegyületekhez sorolható anyagok további vizsgálata elengedhetetlen. Az új tudományos irányzatokhoz igazodva, a klasszikusnak számító toxikológiai végpontok vizsgálata mellett a jövőben érdemes lesz feltárni ezen vegyületek génexpresszióra gyakorolt hatásait is.

## 9. Summary

As a result of industrial development and modern living, countless chemicals are released into the environment and thus into our drinking water bases. These substances can react with each other as well as with organic matter in raw water, especially when exposed to potent oxidants, ozone or UV radiation during the production of drinking water. In the urbanized areas, such as around Budapest, one of the largest rivers in Europe, passing through industrially important cities, the Danube also contains many pollutants of communal origin. In the previous studies, drinking water from Danube-shore-filtered wells was investigated and its genotoxic effect on bacteria (Sujbert et al. 1993) and its effect on apoptotic activity (Rácz et al. 2004) was investigated in cell culture.

In my research I investigated the effects of two water treatment by-products, 2,4-difluoroaniline (DFA) and 4-ethylbenzaldehyde (EBA) on zebrafish. EBA is a metabolite of ibuprofen, one of the most commonly used analgesic, which can be degraded by water treatment. EBA is used in the food industry as a flavor and fragrance due to its almond-like aroma. In my research, I focused mainly on the study of this substance because there is very little information in the literature on its effects, despite the fact that it may pose a potential threat to aquatic ecosystems and even to human health.

Publications to date, the first step was to determine the LC values for zebrafish embryos using the fish embryo acute toxicity test (OECD 236) at 0-120 hpf exposure time. In addition, for the microarray study, I determined the LC values in the 96-120 hpf exposure window, because embryos now undergo the most intense part of their development (Strähle et al. 2012), and embryos are more sensitive to hormonal effects at this stage of their life (Fetter et al. 2015). I have also described the developmental abnormalities caused by the compounds in the 72 hpf embryos and in case of EBA, in the 96-120 hpf exposure window.

I continued my experiments with a more detailed examination of the EBA. As a first step, I performed a microarray assay to map the effects of the substance on gene function. Transcriptome analysis revealed that genes whose expression varies in a concentration-dependent manner under the influence of EBA can be classified into three clusters. Genes related to DNA damaging effects, DNA repair mechanisms and cellular stress response can be classified into Cluster 1. The expression of the genes of the cluster increased with the increase of the treatment concentrations, so I concluded that the substance has a DNA damaging effect. To prove this hypothesis, I used the comet assay method to prove the damaging effect of EBA on DNA. I tested this effect in adult individuals using a micronucleus assay in a subchronic treatment (21 days) and confirmed that EBA increases DNA fragmentation in adult zebrafish. Genes in Cluster 2 have biological functions related to cell division and cell cycle processes, and their exposure decreases with increasing

treatment concentration. From this I concluded that the substance has a negative effect on cell division and thus on regeneration. Tail regeneration assay has shown that EBA reduces the regenerative capacity of zebrafish embryos and thus has a negative effect on cell division processes. Furthermore, with the help of the GeneMANIA prediction server I identified an 18-member gene network based on co-expression and physical interaction. The expression of Cluster 3 genes increased only in the highest concentration-treated group compared to the control.

Based on my results it can be said that further investigation of the substances belonging to the water purification by-product compounds is essential. In line with new scientific trends, in addition to examining classical toxicological endpoints, it will be worth exploring the effects of these compounds on gene expression in the future.

## 10. Mellékletek

### M1 Irodalomjegyzék

- 1272/2008 EK: rendelet az anyagok és keverékek osztályozásáról, címkézéséről és csomagolásáról, a 67/548/EGK és az 1999/45/EK irányelv módosításáról és hatályon kívül helyezéséről, valamint az 1907/2006/EK rendelet módosításáról
- 201/2001. (X. 25.) Korm. rendelet az ivóvíz minőségi követelményeiről és az ellenőrzés rendjéről
- 2010/63/EU: Az Európai Parlament és a Tanács 2010/63/EU irányelve a tudományos célokra felhasznált állatok védelméről
- 98/83/EK: Az Európai Tanács irányelve az emberi fogyasztásra szánt ivóvíz minőségéről
- Abd-Allah GA., El-Fayoumi RI., Smith MJ., Heckmann RA., O'Neill KL. (1999): A comparative evaluation of aflatoxin B1 genotoxicity in fish models using the comet assay. *Mutation Research*, 446: 181–188.
- Abramovici A. & Rachmuth-Roizman P. (1983): Molecular structure-teratogenicity relationships of some fragrance additives. *Toxicology*, 29(1-2): 143-156.
- Adams SS., Bough RG., Cliffe EE., Lessel B., Mills RFN. (1969): Absorption, distribution and toxicity of ibuprofen. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 15(2): 310–330.
- Alcamo J., Flörke M., Märker M. (2007): Future long-term changes in global water resources driven by socio-economic and climatic changes. *Hydrological Sciences Journal*, 52(2): 247-275.
- Al-Sabti K., Metcalfe CD. (1995): Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 343(2–3): 121-135.
- Al-Saidi M., Elagib NA. (2017): Towards understanding the integrative approach of the water, energy and food nexus. *Science of the Total Environment*, 574 :1131-1139.
- Amchova P., Kotolova H., Ruda-Kucerova J. (2015): Health safety issues of synthetic food colorants. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 73(3): 914-922.
- Andersen, A. (2006): Final report on the safety assessment of benzaldehyde. *International Journal of Toxicology*, 25 Suppl 1: 11-27.
- Ankley GT., Johnson RD. (2004): Small fish models for identifying and assessing the effects of endocrine-disrupting chemicals. *ILAR Journal*, 45(4): 469-83.
- Ashbolt N.J. (2004): Microbial contamination of drinking water and disease outcomes in developing regions. *Toxicology*, 198: 229-238.

- Au WW., Giri AK., Ruchirawat M. (2010): Challenge assay: a functional biomarker for exposure-induced DNA repair deficiency and for risk of cancer. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 213:32–39.
- Azqueta A., Collins AR. (2013): The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. *Archives of Toxicology*, 87:949–968.
- Azqueta A., Slyskova J., Langie SA., O’Neill GI., Collins A. (2014): Comet assay to measure DNA repair: approach and applications. *Frontiers in Genetics*, 5:288.
- Bakkiyanathan A., Joseph AM., Tharani L., Malathi R. (2010): Genistein, the phyto-estrogen induces heart-and-soul (has) phenotypes in zebrafish embryo. *Journal of Developmental Biology and Tissue Engineering*, 2 (2): 18–22.
- Bakos K., Kovacs R., Staszny A., Sipos DK., Urbanyi B., Muller F., Csenki Z., Kovacs B. (2013): Developmental toxicity and estrogenic potency of zearalenone in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*, 136-137: 13-21.
- Bakos (Csenki-) K. (2014): Ösztrogén hatást kimutató biomarker zebradánió vonal létrehozása, Doktori (PhD) értekezés, Szent István Egyetem, Gödöllő.
- Bakos K., Kovacs R., Balogh E., Sipos DK., Reining M., Gyomrei-Neuberger O., Balazs A., Kriszt B., Bencsik D., Csepeli A., Gazsi G. (2019): Estrogen sensitive liver transgenic zebrafish (*Danio rerio*) line (Tg (vtg1: mCherry)) suitable for the direct detection of estrogenicity in environmental samples. *Aquatic Toxicology*, 208:157-167.
- Banerji R., Eble DM., Iovine MK., Skibbens RV. (2016): Esco2 regulates cx43 expression during skeletal regeneration in the zebrafish fin. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, 245(1):7-21.
- Baribeau H., Prevost M., Desjardins R., Lafrance P., Gates DJ. (2002): Chlorite and chlorate ion variability in distribution systems. *Journal of the American Water Works Association*, 94(7):96–105
- Barra, A. Baldovini, N., Loiseuau, A.-M., Albino, L., Lesecq, C. & Lizzani Cuvelier, L. (2007): Chemical analysis of French beans (*Phaseolus vulgaris* L.) by headspace solid phase microextraction (HS-SPME) and simultaneous distillation/extraction (SDE), *Food Chemistry*, 101: 1279-1284.

- Bartoskova M., Dobsikova R., Stancova V., Zivna D., Blahova J., Marsalek P., Zelnickova L., Bartos M., di Tocco FC., Faggio C. (2013): Evaluation of ibuprofen toxicity for zebrafish (*Danio rerio*) targeting on selected biomarkers of oxidative stress. *Neuro Endocrinology Letters*, 34 Suppl 2:102-8
- Benner J., Ternes TA. (2009a): Ozonation of metoprolol: Elucidation of oxidation pathways and major oxidation products. *Environmental Science&Technology*, 43(14):5472–5480.
- Benner J., Ternes TA. (2009b) Ozonation of propranolol: formation of oxidation products. *Environmental Science&Technology*, 43(13):5086–5093.
- Bichsel Y., Von Gunten U. (1999): Oxidation of iodide and hypiodous acid in the disinfection of natural waters. *Environmental Science&Technology*, 33(22):4040–4045
- Bichsel Y., Von Gunten U. (2000): Formation of iodo-trihalomethanes during disinfection and oxidation of iodide-containing waters. *Environmental Science&Technology*, 34:2784–2791
- Boller K., Schmid W. (1970): Chemische Mutagenese beim Säuger. Das Knochenmark des Chinesischen Hamsters als in vivo-Testsystem. Hämatologische Befunde nach Behandlung mit Trenimon, 11: 35-54.
- Bolognesi C., Buschini A., Branchi E., Carboni P., Furlini M., Martino A., Monteverde M., Poli P., Rossi C. (2004): Comet and micronucleus assays in zebra mussel cells for genotoxicity assessment of surface drinking water treated with three different disinfectants. *Science of The Total Environment*, 333(1–3): 127-136.
- Bond CE. (1979): *Biology of Fishes*. WB Saunders Company, Philadelphia, PA. 514 pp.
- Boogaard PJ., Fokkema GN., Beulink GD., Bouskill J., van Sittert NJ. (1994): Molecular dosimetry of 2,4-difluoroaniline in humans and rats by determination of hemoglobin adducts. *Environmental Health Perspectives*, 102(suppl 6):27-29.
- Boorman GA. (1999): Drinking water disinfection byproducts: review and approach to toxicity evaluation. *Environmental Health Perspectives*, 107(suppl 1):207-17.
- Bretau S., Lee S., Guo S. (2004): Sensitivity of zebrafish to environmental toxins implicated in Parkinson's disease. *Neurotoxicology and Teratology*, 26(6):857-864.
- Brix R., Bahi N., López de Alda MJ., Farre M., Fernandez JM., Barceló (2009): Identification of disinfection by-products of selected triazines in drinking water by LC-Q-ToF-MS/MS and evaluation of their toxicity. *Journal of Mass Spectrometry*, 44(3):330–337.

- Brody H., Rip MR., Vinten-Johansen P., Paneth N., Rachman S. (2000): Map-making and myth-making in Broad Street: the London cholera epidemic. 1854. *The Lancet*, 356(9223): 64-68.
- Brozinski JM., Lahti M., Meierjohann A., Oikari A., Kronberg L. (2012): The anti-inflammatory drugs diclofenac, naproxen and ibuprofen are found in the bile of wild fish caught downstream of a wastewater treatment plant. *Environmental Science&Technology*, 47(1):342-348.
- Bulera SJ., Eddy SM., Ferguson E., Jatko TA., Reindel JF., Bleavins MR. (2001): RNA expression in the early characterization of hepatotoxicants in Wistar rats by high-density DNA microarrays. *Hepatology*, 33:1239–1258.
- Bull RJ., Birnbaum LS., Cantor KP., Rose JB., Butterworth BE., Pegram R., Tuomisto J. (1995): Water chlorination: essential process or cancer hazard? *Fundamental and Applied Toxicology*, 28(2): 155-166.
- Burczynski ME., McMillian M., Ciervo J., Li L., Parker JB., Dunn RT. (2000): Toxicogenomics-based discrimination of toxic mechanism in HepG2 human hepatoma cells. *Toxicological Sciences*, 58:399–415.
- Burdan F., Szumilo J., Dudka J., Korobowicz A., Klepacz R. (2006): Congenital ventricular septal defects and prenatal exposure to cyclo-oxygenase inhibitors. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 39: 925–934.
- Burdan F., Szumilo J., Marzec B., Klepacz R., Dudka J. (2005): Skeletal developmental effects of selective and nonselective cyclooxygenase-2 inhibitors administered through organogenesis and fetogenesis in Wistar CRL:(WI)WUBR rats. *Toxicology*, 216:204–223.
- Buschini A., Martino A., Gustavino B., Monfrinotti M., Poli P., Rossi C., Santoro M., Dörr AJM., Rizzoni M. (2004): Comet assay and micronucleus test in circulating erythrocytes of *Cyprinus carpio* specimens exposed in situ to lake waters treated with disinfectants for potabilization. *Mutation Research*, 557: 119-129.
- Buser HR., Poiger T., Müller MD. (1999): Occurrence and environmental behavior of the chiral pharmaceutical drug ibuprofen in surface waters and in wastewater. *Environmental Science&Technology*, 33(15):2529-2535.



- Cappon GD., Cook JC., Hurtt ME. (2003): Relationship between cyclooxygenase 1 and 2 selective inhibitors and fetal development when administered to rats and rabbits during the sensitive periods for heart development and midline closure. *Birth Defects Research (Part B)*, 68: 47–56.
- Cappon GD., Fleeman TL., Cook JC., Hurtt ME. (2005): Combined treatment potentiates the developmental toxicity of ibuprofen and acetazolamide in rats. *Drug and Chemical Toxicology*, 28, 409–421.
- Catto C., Charest-Tardif G., Rodriguez M., Tardif R. (2013): Accounting for the impact of short term variations in the levels of trihalomethane in drinking water on exposure assessment for epidemiological purposes. Part II: biological aspects. *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology*, 23: 60-66.
- Causton HC., Ren B., Koh SS., Harbison CT., Kanin E., Jennings EG. (2001): Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. *Molecular Biology of the Cell*, 12:323–337.
- Cavas T. (2011): In vivo genotoxicity evaluation of atrazine and atrazine-based herbicide on fish. *Food and Chemical Toxicology*, 49: 1431-1435.
- Cha YI., Kim SH., Solnica-Krezel L., Dubois RN. (2005): Cyclooxygenase-1 signaling is required for vascular tube formation during development. *Journal of Developmental Biology*, 282: 274–283.
- Cha YI., Kim SH., Solnica-Krezel L., Dubois RN. (2006): Fishing for prostanoids: deciphering the developmental functions of cyclooxygenase-derived prostaglandins. *Developmental Biology* 289: 263–272.
- Chetaille P., Preuss C., Burkhard S., Côté JM., Houde C., Castilloux J., Piché J., Gosset N., Leclerc S., Wünnemann F., Thibeault M., Gagnon C., Galli A., Tuck E., Hickson GR., Amine N.E., Boufaied I., Lemyre E., de Santa Barbara P., Faure S., Jonzon A., Cameron M., Dietz HC., Gallo-McFarlane E., Benson DW., Moreau C., Labuda D., FORGE Canada Consortium, Zhan SH., Shen Y., Jomphe M., Jones SJ., Bakkers J., Andelfinger G. (2014): Mutations in SGOL1 cause a novel cohesinopathy affecting heart and gut rhythm. *Nature Genetics*, 46(11):1245-1249.
- Chisholm K., Cook A., Bower C., Weinstein P. (2008): Risk of birth defects in Australian communities with high levels of brominated disinfection by-products. *Environmental Health Perspectives*, 116(9): 1267-1273.

- Choi J., Valentine RL. (2002): Formation of N-nitrosodimethylamine (NDMA) from reaction of monochloramine: a new disinfection by-product. *Water Research*, 36(4): 817-824.
- Collins AR. (2014): Measuring oxidative damage to DNA and its repair with the comet assay. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1840:794–800.
- Cook JC., Jacobson CF., Gao F., Tassinari MS., Hurtt ME., DeSesso JM. (2003): Analysis of the nonsteroidal anti-inflammatory drug literature for potential developmental toxicity in rats and rabbits. *Birth Defects Research (Part B)*, 68: 5–26.
- Crittenden JC., Trussell RR., Hand DW., Howe KJ., Tchobanoglous G. (2005): *Water Treatment: Principles and Design*. 2nd Edition. Hoboken, NJ:Wiley. ISBN 0-471-11018-3.
- David A., Pancharatna K. (2009): Developmental anomalies induced by a non-selective COX inhibitor (ibuprofen) in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 27(3):390-395.
- Dawson DJ., Sartory DP. (2000): Microbiological safety of water. *British Medical Bulletin*, 56(1): 74-83.
- Demir E., Kocaoğlu S., Kaya B. (2008): Genotoxicity testing of four benzyl derivatives in the *Drosophila* wing spot test. *Food and Chemical Toxicology*, 46(3):1034-1041.
- Demir E., Kocaoğlu S., Kaya B. (2010): Assessment of genotoxic effects of benzyl derivatives by the comet assay. *Food and Chemical Toxicology*, 48(5): 1239–1242.
- Devaux A., Flammarion P., Bernardon V., Garric J., Monod G. (1998): Monitoring of the chemical pollution of the river Rhone through measurement of DNA damage and cytochrome P-450IA induction in chub (*Leuciscus cephalus*), *Marine Environmental Research*, 46: 257–262.
- Deventer K. (1996): Detection of genotoxic effects on cells of liver and gills of *B. rerio* by means of single cell gel electrophoresis. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 56: 911–918.
- Dodd MC., Shah AD., Von Gunten U., Huang C-H. (2005): Interactions of fluoroquinolone antibacterial agents with aqueous chlorine: reaction kinetics, mechanisms, and transformation pathways. *Environmental Science & Technology*, 39:7065–7076.
- Dotson A., Westerhoff P., Krasner SW. (2009): Nitrogen enriched dissolved organic matter (DOM) isolates and their affinity to form emerging disinfection by-products. *Water Science and Technology*, 60(1): 135-143.

- Duirk SE., Collette TW. (2006): Degradation of chlorpyrifos in aqueous chlorine solutions: pathways, kinetics and modeling. *Environmental Science&Technology*, 40: 546–551.
- Eadsforth CV., Logan CJ., Morrison BJ., Warburton PA. (1984): 2,4-difluoroaniline and 4-fluoroaniline exposure: Monitoring by methaemoglobin and urine analyses. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 54: 223-232.
- EFSA Scientific Committee (2011): Scientific opinion on genotoxicity testing strategies applicable to food and feed safety assessment. *EFSA Journal*, 9: 2379–2447.
- EFSA (2012): Scientific opinion on flavouring group Evaluation 20, Revision 4 (FGE.20REV4): benzyl alcohols, benzaldehydes, a related acetal, benzoic acids, and related esters from chemical groups 23 and 30, European Food Safety Authority, *EFSA Journal*, 10 (12): 2994
- Eisen JS. (1996): Zebrafish make a big splash. *Cell*, 87(6): 969.
- Eleršek T., Plazar J., Filipič M. (2013): A method for the assessment of DNA damage in individual, one day old, zebrafish embryo (*Danio rerio*), without prior cell isolation. *Toxicology in Vitro*, 27(8): 2156-2159.
- Engeszer RE., Patterson LB., Rao AA. (2007): Zebrafish in the wild: a review of natural history and new notes from the field. *Zebrafish*, 4(1): 21–40.
- Evans HJ., Neary GJ., Williamson FS. (1959): The Relative Biological Efficiency of Single Doses of Fast Neutrons and Gamma-rays on *Vicia Faba* Roots and the Effect of Oxygen. *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine*, 1(3): 216-229.
- Faisal Z., Garai E., Csepregi R., Bakos K., Fliszár-Nyúl E., Sente L., Balázs A., Cserhádi M., Kőszegi T., Urbányi B., Csenki Z. (2019): Protective effects of beta-cyclodextrins vs. zearalenone-induced toxicity in HeLa cells and Tg (*vtg1: mCherry*) zebrafish embryos. *Chemosphere*, 124948.
- FAO (2017): Water for sustainable food and agriculture, A report produced for the G20 presidency of Germany, Róma, Olaszország.
- Fent K., Weston A., Caminada D. (2006): Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology*, 76(2): 122–159.
- Fetter E., Smetanová S., Baldauf L., Lidzba A., Altenburger R., Schüttler A., Scholz S. (2015): Identification and Characterization of Androgen-Responsive Genes in Zebrafish Embryos. *Environmental Science&Technology*, 49(19): 11789–11798.

- Galloway SM., Bloom AD., Resnick M., Margolin BH., Nakamura F., Archer P. (1985): Development of a standard protocol for in vitro cytogenetic testing with Chinese hamster ovary cells: comparison of results for 22 compounds in two laboratories. *Environmental Mutagenesis*, 7: 1–51.
- Gasch AP., Spellman PT., Kao CM., Carmel-Harel O., Eisen MB., Storz G. (2000): Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Molecular Biology of the Cell*, 11: 4241–4257.
- Gerhard GS., Cheng KC. (2002): A call to fins! Zebrafish as a gerontological model. *Aging Cell*, 1(2): 104–111.
- Glei M., Schaeferhenrich A., Claussen U., Kuechler A., Liehr T., Weise A., Marian B., Sendt W., Pool-Zobel BL. (2007): Comet fluorescence in situ hybridization analysis for oxidative stress-induced DNA damage in colon cancer relevant genes. *Toxicological Sciences*, 96: 279–284.
- Glei M., Hovhannisyan G., Pool-Zobel BL. (2009): Use of Comet-FISH in the study of DNA damage and repair: review. *Mutation Research*, 681: 33–43.
- Glei M., Schlörmann W. (2014): Analysis of DNA damage and repair by comet fluorescence in situ hybridization (Comet-FISH). *Methods in Molecular Biology*, 1094: 39–48.
- Glei M., Schneider T., Schlörmann W. (2016): Comet assay: an essential tool in toxicological research. *Archives of Toxicology*, 90(10): 2315-2336.
- Gloire G., Legrand-Poels S., Piette J. (2006): NF-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later. *Biochemical Pharmacology*, 72: 1493-1505.
- Gómez-Oliván LM., Galar-Martínez M., García-Medina S., Valdés-Alanís A., Islas-Flores H., Neri-Cruz N. (2014): Genotoxic response and oxidative stress induced by diclofenac, ibuprofen and naproxen in *Daphnia magna*. *Drug and Chemical Toxicology*, 37(4): 391-399.
- Grosser T., Yusuff S., Cheskis E., Pack MA., FitzGerald GA. (2002): Developmental expression of functional cyclooxygenases in zebrafish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99: 8418–8423.
- Grotek B., Wehner D., Weidinger G. (2013): Notch signaling coordinates cellular proliferation with differentiation during zebrafish fin regeneration. *Development*, 140(7): 1412-1423.
- Grunwald DJ., Eisen JS. (2002): Timeline—Headwaters of the zebrafish emergence of a new model vertebrate. *Nature Reviews Genetics*, 3(9): 717–724.

- Gutzkow KB., Langleite TM., Meier S., Graupner A., Collins AR., Brunborg G. (2013): High-throughput comet assay using 96 minigels. *Mutagenesis*, 28: 333–340.
- Hamadeh HK., Bushel PR., Jayadev S., Martin K., DiSorbo O., Sieber S. (2002): Gene expression analysis reveals chemicals specific profiles. *Toxicological Sciences*, 67: 219–231.
- Harris RH., Epstein SS., Moreau JA., Page T., Vermeij EZ. (1974): The implications of cancer-causing substances in Mississippi River water. *Environmental Defense Fund*.
- Harrison JH., Jollow DJ. (1987): Contribution of aniline metabolites to aniline-induced methemoglobinemia. *Molecular Pharmacology*, 32: 423–431.
- Heddle JA. (1973): A rapid in vivo test for chromosomal damage. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 18(2): 187-190.
- Hill AJ., Teraoka H., Heideman W. (2005): Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicological Sciences*, 86(1): 6–19.
- Hoehn RC., Ellenberger CS., Gallagher DL., Wiseman ETV. Jr, Benninger RW., Rosenblatt A. (2003): ClO<sub>2</sub> and by-product persistence in a drinking water system. *Journal of the American Water Works Association*, 95(4): 141–150.
- Hooftman RN. (1981): The induction of chromosome aberrations in *Notobranchius rachowi* (pisces: cyprinodontidae) after treatment with ethyl methanesulphonate or benzo[a]pyrene. *Mutation Research Letters*, 91(4–5): 347-352.
- Hooftman RN., de Raat WK. (1982): Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pygmaea* by ethyl methanesulphonate. *Mutation Research Letters*, 104(1–3): 147-152.
- Horn P, Zsilinszky S. (1983): *Akvarisztika*, Natura Kiadó, Budapest, 188-191.
- Horne-Badovinac S., Lin D., Waldron S., Schwarz M., Mbamalu G., Pawson T., Jan YN., Stainier DYR., Abdelilah-Seyfried S. (2001): Positional cloning of heart and soul reveals multiple roles for PKC in zebrafish organogenesis. *Current Biology*, 11: 1492–1502.
- Howard-Jones N. (1984): Robert Koch and the cholera vibrio: a centenary. *British Medical Journal (Clinical Research Edition)*, 288, 379-381.
- Hoyt PR., Doktycz MJ., Beattie KL., Greeley MS. (2003): DNA microarrays detect 4-nonylphenol-induced alterations in gene expression during zebrafish early development. *Ecotoxicology*, 12(6):469-474.
- Hrudey SE. (2009): Chlorination disinfection by-products, public health risk tradeoffs and me. *Water Research*, 43: 2057-2092.

- Hua G., Reckhow DA., Kim J. (2006): Effect of bromide and iodide ions on the formation and speciation of disinfection byproducts during chlorination. *Environmental Science&Technology*, 40: 3050-3056.
- Huff J., LaDou J. (2007): Aspartame bioassay findings portend human cancer hazards. *International Journal of Occupational and Environmental Health*, 13(4): 446-448.
- Hunter ES., Rogers EH., Schmid JE., Richard A. (1996): Comparative effects of haloacetic acids in whole embryo culture. *Teratology*, 54 (2): 57-64.
- Hunter ES., Tugman JA. (1995): Inhibitors of glycolytic metabolism affect neurulation-staged mouse conceptuses in vitro. *Teratology*, 52(6): 317-323.
- Hwang BF., Jaakkola JJ., Guo HR. (2008): Water disinfection by-products and the risk of specific birth defects: a population-based cross-sectional study in Taiwan. *Environmental Health*, 7(1): 23.
- Jansson T., Curvall M., Hedin A., Enzell CR. (1988): In vitro studies of the biological effects of cigarette smoke condensate. III. Induction of SCE by some phenolic and related constituents derived from cigarette smoke. A study of structure-activity relationships. *Mutation Research*, 206: 17–24.
- Joll CA., Alessandrino MJ., Heitz A. (2010): Disinfection by-products from halogenation of aqueous solutions of terpenoids. *Water Research*, 44(1):232–242.
- Kanasawud P., Crouzet JC. (1990): Mechanism of formation of volatile compounds by thermal degradation of carotenoids in aqueous medium. 1. Beta-Carotene degradation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(1): 237–243.
- Kimmel CB., Ballard WW., Kimmel SR., Ullmann B., Schilling TF. (1995): Stages of embryonic-development of the zebrafish. *Developmental Dynamics*, 203: 253-310.
- Kligerman AD., Bloom SE., Howell WM. (1975): Umbra Limi: A model for the study of chromosome aberrations in fishes. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 31(4): 225-233.
- Kogevinas M., Villanueva CM., Font-Ribera L., Liviak D., Bustamante M., Espinoza F., Nieuwenhuijsen MJ., Espinosa A., Fernandez P., DeMarini DM., Grimalt JO. (2010): Genotoxic effects in swimmers exposed to disinfection by-products in indoor swimming pools. *Environmental Health Perspectives*, 118(11): 1531-1537.

- Kolpin DW., Furlong ET., Meyer MT., Thurman EM., Zaugg SD., Barber LB., Buxton HT. (2002): Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999–2000: A national reconnaissance. *Environmental Science&Technology*, 36: 1202–1211.
- Komulainen H., Vaittinen SL., Vartiainen T., Tuomisto J., Kosma VM., Kaliste-Korhonen E., Lötjönen S., Tuominen R. (1997): Carcinogenicity of the drinking water mutagen 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2 (5H)-furanone in the rat. *Journal of the National Cancer Institute*, 89(12): 848-856.
- Kosmehl T., Hallare AV., Reifferscheid G., Manz W., Braunbeck T., Hollert H. (2006): A novel contact assay for testing genotoxicity of chemicals and whole sediments in zebrafish embryos. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25: 2097-2106.
- Kosmehl T., Krebs F., Manz W., Braunbeck T., Hollert H. (2007): Differentiation Between Bioavailable and Total Hazard Potential of Sediment Induced DNA Fragmentation as Measured by the Comet Assay with Zebrafish Embryos. *Journal of Soils and Sediments*, 7(6): 377–387.
- Kovács R., Csenki Zs., Bakos K., Urbányi B., Horváth Á., Garaj-Vrhovac V., Gajski G., Gerić M., Negreira N., López M. de Alda, Barceló D., Heath E., Kosjek T., Žegura B., Novak M., Zajc I., Baebler S., Rotter A., Ramšak Z., Filipič M. (2015): Assessment of toxicity and genotoxicity of low doses of 5-fluorouracil in zebrafish (*Danio rerio*) two-generation study, *Water Research*, 77, 201-212,
- Kozisek F., Pomykacova I., Jeligova H., Cadek V., Svobodova V. (2013): Survey of human pharmaceuticals in drinking water in the Czech Republic. *Journal of Water Health*, 11: 84–97.
- Krasner SW., Weinberg HS., Richardson SD., Pastor SJ., Chinn R., Scilimenti MJ., Onstad GD., Thruston AD. (2006): Occurrence of a new generation of disinfection byproducts. *Environmental Science&Technology*, 40(23): 7175-7185.
- Krings U., Berger RG. (1998): Biotechnological production of flavours and fragrances. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 49(1): 1-8.

- Kronberg L., Holmbom B., Reunanen M., Tikkanen L. (1998): Identification and quantification of the Ames mutagenic compound 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2 (5H)-furanone and of its geometric isomer (E)-2-chloro-3-(dichloromethyl)-4-oxobutenoic acid in chlorine-treated humic water and drinking water extracts. *Environmental Science&Technology*, 22(9):1097-1103.
- Kundu B., Richardson SD., Swartz PD., Matthews PP., Richard AM., DeMarini DM. (2004): Mutagenicity in Salmonella of halonitromethanes: a recently recognized class of disinfection by-products in drinking water. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 562(1): 39-65.
- Kurokawa Y., Aoki S., Matsushima Y., Takamura N., Imazawa T., Hayashi Y. (1986a): Dose-response studies on the carcinogenicity of potassium bromate in F344 rats after long-term oral administration. *Journal of the National Cancer Institute*, 77(4):977-982.
- Kurokawa Y., Takayama S., Konishi Y. (1986b): Long-term in vivo carcinogenicity tests of potassium bromate, sodium hypochlorite, and sodium chlorite conducted in Japan. *Environmental Health Perspectives*, 69: 221–235.
- Landi S., Hanley NM., Warren SH., Pegram RA., DeMarini DM. (1999): Induction of genetic damage in human lymphocytes and mutations in Salmonella by trihalomethanes: role of red blood cells and GSTT1-1 polymorphism. *Mutagenesis*, 14: 479-482.
- Le Guen S., Prost C., Demaimay M. (2000): Characterization of odorant compounds of mussels (*Mytilus edulis*) according to their origin using gas chromatography-olfactometry and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 896(1-2): 361-371.
- Lee RF., Kim GB, Maruya KA. (1999): Uptake of toxaphene congeners by grass shrimp in estuarine site contaminated with toxaphene, Abstracts from 20th Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Pensacola, FL, p. 121.
- Leenheer JA., Croué JP. (2003): Aquatic organic matter understanding the unknown structures is key to better treatment of drinking water. *Environmental Science&Technology*, 1: 19-26.
- Lettieri T. (2005): Recent applications of DNA microarray technology to toxicology and ecotoxicology. *Environmental Health Perspectives*, 114(1): 4-9.
- Li C., Wang D., Xu X., Xu M., Wang Z. (2017): Spatial variations in the occurrence of potentially genotoxic disinfection by-products in drinking water distribution systems in China. *Environmental Pollution*, 231: 1463-1468.



- Li Y., Feng X., Du W., Li Y., Liu BF. (2013): Ultrahigh-throughput approach for analyzing single-cell genomic damage with an agarose-based microfluidic comet array. *Analytical Chemistry*, 85: 4066–4073.
- Lieschke GJ., Currie PD. (2007): Animal models of human disease: Zebrafish swim into view. *Nature Reviews Genetics*, 8: 353-367.
- Liu Y., Sakagami H., Hashimoto K., Kikuchi H., Amano O., Ishihara M. (2008): Tumor-specific cytotoxicity and type of cell death induced by beta-cyclodextrin benzaldehyde inclusion compound. *Anticancer Research*, 28: 229–236.
- Liviak D., Creus A., Marcos R. (2010): DNA damage induction by two halogenated acetaldehydes, byproducts of water disinfection. *Water Research*, 44(8): 2638-2646.
- Lloyd M., Kidd D. (2012): The mouse lymphoma assay. In: *Genetic Toxicology*. Springer, New York, NY., 35-54.
- Lo HH., Brown PI., Rankin GO. (1990): Acute nephrotoxicity induced by isomeric dichloroanilines in Fischer 344 rats. *Toxicology*, 63: 215-231.
- Lo HH., Brown PI., Rankin GO (1991): Trichloroaniline effects on renal function in vivo and in vitro. *Toxicology Letters*, 57: 319–328.
- Locas A., Barthe C., Barbeau B., Carriere A., Payment P. (2007): Virus occurrence in municipal groundwater sources in Quebec, Canada. *Canadian Journal of Microbiology*, 53: 688-694.
- Lonchamp J., Barry-Ryan C., Devereux M. (2009): Identification of volatile quality of ready-to-use lettuce and cabbage. *Food Research International*, 42: 1077-1086.
- Machado AA., Hoff ML., Klein RD., Cardozo JG., Giacomini MM., Pinho GL., Bianchini A. (2013): Biomarkers of waterborne copper exposure in the guppy *Poecilia vivipara* acclimated to salt water. *Aquatic Toxicology*, 138: 60-69.
- Madhavan J., Grieser F., Ashokkumar M. (2010): Combined advanced oxidation processes for the synergistic degradation of ibuprofen in aqueous environments. *Journal of Hazardous Materials*, 178(1-3): 202-208.
- Magyar Szabvány MSZ 450/1-1989: Ivóvíz minősítés fizikai és kémiai vizsgálat alapján
- Maruya K., Kim GB., Smalling KL., Lee RF. (2000): DNA damage in fish blood: a novel bioindicator of environmental stress, Abstracts from the 21st Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Pensacola, FL, p. 39.

- Marx JL. (1974): Drinking water: Another source of carcinogens? *Science*, 809-811.
- McGuire MJ., McLain JL., Obolensky A. (2002): Information collection rule data analysis. American Water Works Association Research Foundation, Denver, CO.
- McKim JM., Schmieder PK., Niemi GJ., Carlson RW., Henry TR. (1987): Use of respiratory-cardiovascular responses of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) in identifying acute toxicity syndromes in fish: Part 2. malathion, carbaryl, acrolein and benzaldehyde. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 4:313-28.
- Mitch WA., Sharp JO., Trussell RR., Valentine RL, Alvarez-Cohen L., Sedlak DL. (2003): N-Nitrosodimethylamine (NDMA) as a Drinking Water Contaminant: A Review. *Environmental Engineering Science*, 20(5): 389-404.
- Mohanty G., Mohanty J., Jena SD., Dutta SK. (2011): Genotoxicity testing in pesticide safety evaluation. In: *Pesticides in the Modern World-Pests Control and Pesticides Exposure and Toxicity Assessment*, 2011 Oct 3. IntechOpen.
- Momba MN., Kaleni P. (2002): Regrowth and survival of indicator microorganisms on the surfaces of household containers used for the storage of drinking water in rural communities of South Africa. *Water Research*, 36: 3023-3028.
- Morin B., Filatreau J., Vicquelin L., Barjhoux I., Guinel S., Leray-Forget J., Cachot J. (2011): Detection of DNA damage in yolk-sac larvae of the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*, by the comet assay. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 399(6): 2235-2242.
- Morita K., Kubota K., Aishima T. (2003): Comparison of aroma characteristics of 16 fish species by sensory evaluation and gas chromatographic analysis, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83: 289-297.
- Moşneang CL., Grozea A., Oprescu I., Dumitrescu E., Muselin F., Gál D., Cristina RT. (2014): Assessment of 2, 4-difluoroaniline Aquatic Toxicity Using A Zebrafish (*Danio rerio*) Model. *The Thai Journal of Veterinary Medicine*, 44(4):445-52.
- Muller-Pillet V., Joyeux M., Ambroise D., Hartemann P. (2000): Genotoxic activity of five haloacetonitriles: comparative investigations in the single cell gel electrophoresis (comet) assay and the Ames-fluctuation test. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 36: 52-58.

- Nakajima M., Kawakami T., Niino T., Takahashi Y., Onodera S. (2009): Aquatic fate of sunscreen agents octyl-4-methoxycinnamate and octyl-4-dimethylaminobenzoate in model swimming pools and the mutagenic assays of their chlorination byproducts. *Journal of Health Sciences*, 55(3): 363–372.
- Nambata T., Terada N., Takeuchi S. (1981): Effect of benzaldehyde on the proliferation of HeLa cells. *Gann= Gan.*, 72(2):289-292.
- Navalon S, Alvaro M, Garcia H (2008): Reaction of chlorine dioxide with emergent water pollutants: Product study of the reaction of three  $\beta$ -lactam antibiotics with  $\text{ClO}_2$ . *Water Research*, 42(8–9):1935–1942
- NCI (1976): Report on the Carcinogenesis Bioassay of chloroform (CAS No. 67-66-3). MD: National Cancer Institute, 1976: 1-60.
- Ofori, B., Oraichi, D., Blais, L., Rey, E., Beirard, A. (2006): Risk of congenital anomalies in pregnant users of non-steroidal anti-inflammatory drugs: A nested case-control study. *Birth Defects Research, (Part B)* 77: 268–279.
- Olive PL., Banáth JP., Durand RE. (1990): Heterogeneity in Radiation-Induced DNA Damage and Repair in Tumor and Normal Cells Measured Using the "Comet" Assay. *Radiation Research*, 122:1: 86-94.
- Ostling O., Johanson KJ. (1984): Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 123(1): 291-298.
- Pahl-Wostl C., Mostert E., Tàbara D. (2008): The growing importance of social learning in water resources management and sustainability science. *Ecology and Society* 13(1):24.
- Parolini M., Binelli A., Provini A. (2011): Chronic effects induced by ibuprofen on the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74(6): 1586–1594.
- Pereira RO., Postigo C., López de Alda M., Daniel LA., Barceló D. (2011): Removal of estrogens through water disinfection processes and formation of by-products. *Chemosphere*, 82:789–799.
- Peterson RT., Mably JD., Chen JN., Fishman MC. (2001): Convergence of distinct pathways to heart patterning revealed by the small molecule concentramide and the mutation heart-and-soul. *Current Biology*, 11: 1481–1491.

- Pettersen EO., Nome O., Rønning ØW., Oftebro R. (1983): Effects of benzaldehyde on survival and cell-cycle kinetics of human cells cultivated in vitro. *European Journal of Cancer and Clinical Oncology*, 19(4): 507–514.
- Plewa MJ., Kargalioglu Y., Vankerk D., Minear RA., Wagner ED. (2002): Mammalian cell cytotoxicity and genotoxicity analysis of drinking water disinfection by-products. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 40: 134-142.
- Plewa MJ., Wagner ED., Jazwierska P., Richardson SD., Chen PH., McKague AB. (2004): Halonitromethane drinking water disinfection byproducts: chemical characterization and mammalian cell cytotoxicity and genotoxicity. *Environmental Science & Technology*. 38(1): 62-68.
- Plewa MJ., Wagner ED., Muellner MG., Hsu KM., Richardson SD. (2008): Comparative Mammalian Cell Toxicity of N-DBPs and C-DBPs. *Disinfection By-Products in Drinking Water*, American Chemical Society, 995: 36-50.
- Prein AE., Thie GM., Alink GM., Koeman JH., Poels CLM. (1978): Cytogenetic changes in fish exposed to water of the river Rhine. *Science of The Total Environment*, 9(3): 287-291.
- Prescott SM., Yost HJ. (2002): The COXes of Danio: from mechanistic model to experimental therapeutics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99: 9084–9086.
- Quinn B., Gagné F., Blaise C. (2008): The effects of pharmaceuticals on the regeneration of the cnidarian, *Hydra attenuata*. *Science of The Total Environment*, 402(1): 62–69.
- Rácz G., Csenki Z., Kovács R., Hegyi Á, 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.
- Racz G., Sujbert L., Bocsi J., Szende B. (2004): Rapid communication: water disinfection by products enhanced apoptotic activity in human lymphocytes. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*, 67: 1315-1319.
- Ragugnetti M, Adams ML., Guimarães AT., Sponchiado G., de Vasconcelos EC., de Oliveira CM. (2011): Ibuprofen genotoxicity in aquatic environment: an experimental model using *Oreochromis niloticus*. *Water, Air & Soil Pollution*, 218(1-4): 361-364.
- Rankin GO., Yang DJ., Cressey-Veneziano K., Casto S., Wang RT., Brown PI. (1986): In vivo and in vitro nephrotoxicity of aniline and its monochlorophenyl derivatives in the Fischer 344 rat. *Toxicology*, 38(3): 269-83.

- Richardson SD., Thruston AD., Rav-Acha C., Groisman L., Popilevsky I., Juraev O., Glezer V., McKague AB., Plewa MJ., Wagner ED. (2003): Tribromopyrrole, brominated acids, and other disinfection byproducts produced by disinfection of drinking water rich in bromide. *Environmental Science&Technology*, 37(17): 3782-3793.
- Richardson SD., Plewa MJ., Wagner ED., Schoeny R., DeMarini DM. (2007): Occurrence, genotoxicity, and carcinogenicity of regulated and emerging disinfection by-products in drinking water: a review and roadmap for research. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 636(1-3):178-242.
- Richardson SD., Fasano F., Ellington JJ., Crumley FG., Buettner KM., Evans JJ., Blount BC., Silva LK., Waite TJ., Luther GW., McKague AB. (2008a): Occurrence and mammalian cell toxicity of iodinated disinfection byproducts in drinking water. *Environmental Science&Technology*; 42(22):8330-8338.
- Richardson SD., Thruston AD. Jr., Krasner SW., Weinberg HS., Miltner RJ., Schenck KM., Narotsky MG., McKague AB., Simmons JE. (2008b): Integrated Disinfection By-Products Mixtures Research: Comprehensive Characterization of Water Concentrates Prepared from Chlorinated and Ozonated/Postchlorinated Drinking Water, *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 71(17): 1165-1186.
- Richardson SD., Postigo C. (2011): Drinking water disinfection by-products, In: *The Handbook of Environmental Chemistry*, Springer, Boston, MA, pp. 93-137.
- Rocco L., Frenzilli G., Fusco D., Peluso C., Stingo V. (2010): Evaluation of zebrafish DNA integrity after exposure to pharmacological agents present in aquatic environments. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73(7):1530-1536.
- Roodbari F., Abedi N., Talebi AR. (2015): Early and late effects of Ibuprofen on mouse sperm parameters, chromatin condensation, and DNA integrity in mice. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*, 13(11): 703–710.
- Rook JJ. (1974): Formation of haloforms during chlorination of natural waters. *Water Treatment Exam*, 23: 234-243.
- Rook JJ. (1976): Haloforms in Drinking Water. *Journal of the American Water Works Association*, 68(3): 168-172.
- Rositano J., Newcombe G., Nicholson B., Sztajn bok P. (2001): Ozonation of NOM and algal toxins in four treated waters. *Water Research*, 35: 23-32.
- Rydberg B., Johanson KJ. (1978): Estimation of DNA strand breaks in single mammalian cells. In: *DNA repair mechanisms*. Academic Press, pp. 465-468

- Saravanan M, Usha Devi K, Malarvizhi A, Ramesh M (2012) Effects of Ibuprofen on hematological, biochemical and enzymological parameters of blood in an Indian major carp, *Cirrhinus mrigala*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 34:14–22.
- Scholz S., Fischer S., Gündel U., Küster E., Luckenbach T., Voelker D. (2008): The zebrafish embryo model in environmental risk assessment—applications beyond acute toxicity testing. *Environmental Science and Pollution Research*, 15(5): 394-404.
- Schulten HR., Schnitzer MA. (1993): State of the art structural concept for humic substances, *Naturwissenschaften*, 80: 29-30
- Shaposhnikov S., Azqueta A., Henriksson S., Meier S., Gaivao I., Huskisson NH., Smart A., Brunborg G., Nilsson M., Collins AR. (2010): Twelve-gel slide format optimised for comet assay and fluorescent in situ hybridisation. *Toxicology Letters*, 195:31–34.
- Shaposhnikov S., Thomsen PD., Collins AR. (2011): Combining fluorescent in situ hybridization with the comet assay for targeted examination of DNA damage and repair. *Methods in Molecular Biology*, 682:115–132.
- Shimoda M., Shigematsu H., Shiratsuchi H., Osajima Y. (1995): Comparison of volatile compounds among different grades of green tea and there relations to odor attributes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43: 1621-1625.
- Silva MCE., Silva LR., Guedes-de-Pinho P., Costa R. (2012): Volatile compounds in salted dried codfishes from different species, *Acta Alimentaria*, 41 (3), 375-388.
- Simon O., Massarin S., Coppin F., Hinton T.G., Gilbin R. (2011): Investigating the embryo/larval toxic and genotoxic effects of gamma irradiation on zebrafish eggs. *Journal of Environmental Radioactivity*, 102: 1039-1044.
- Singh NP., McCoy MT., Tice RR., Schneider EL. (1988): A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175:1: 184-191.
- Smit P. & Heniger J. (1975): Antoni van Leeuwenhoek (1632-1723) and the discovery of bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 41: 219-228.
- Smith EM., Plewa MJ., Lindell CL., Richardson SD., Mitch WA. (2010): Comparison of Byproduct Formation in Waters Treated with Chlorine and Iodine: Relevance to Point-of-Use Treatment. *Environmental Science&Technology*, 44(22): 8446-8452.
- Spence R., Smith C. (2005): Male territoriality mediates density and sex ratio effects on oviposition in the zebrafish, *Danio rerio*. *Animal Behaviour*, 69:1317–1323.

- Spitsbergen JM., Kent ML. (2003): The State of the Art of the Zebrafish Model for Toxicology and Toxicologic Pathology Research. Advantages and Current Limitations Toxicologic Pathology, 31: 62-87.
- Stanger M., Agutter PA., Lake RC., Ashbolt NJ., Roser DJ. (2006): Microbial risk and removal-a utility perspective. Water Science and Technology, 54: 253-259.
- Strähle U., Scholz S., Geisler R., Greiner P., Hollert H., Rastegar S., Schumacher A., Selderslaghs I., Weiss C., Witters H., Braunbeck T. (2012): Zebrafish embryos as an alternative to animal experiments—a commentary on the definition of the onset of protected life stages in animal welfare regulations. Reproductive Toxicology, 33(2):128-32.
- Sujbert L., Kollar G., Ollos G., Ribari L. (1993): Measuring the genotoxic potential in two drinking water resources of Budapest in Salmonella/microsome system. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 51(3): 349-355.
- Symons JM., Bellar TA., Carswell JK., DeMarco J., Kropp KL, Robeck GG, Seeger DR., Slocum CJ., Smith BL., Stevens AA. (1975): National organics reconnaissance survey for halogenated organics. Journal of the American Water Works Association, 67: 634-647.
- Szilágyi F. (2003): Mérnökökológia, Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Építőmérnöki Kar, Budapest, 7-14.
- Tabatabaie T., Floyd RA. (1996): Inactivation of Glutathione Peroxidase by Benzaldehyde. Toxicology and Applied Pharmacology, 141(2), 389–393.
- Tan RS., Bajo LM. (2014): Modulation of *Tinospora rumphii* and Zinc Salt on DNA Damage in Quinoline-Induced Genotoxicity and Hepatotoxicity in Male Albino Mice. Advances in Toxicology, 2014: 1-9.
- Tay KS., Rahman NA., Bin Abas MR. (2010): Ozonation of parabens in aqueous solutions: kinetics and mechanisms of degradation. Chemosphere, 81:1446–1453.
- Terasaki M., Makino M. (2008): Determination of chlorinated by-products of parabens in swimming pool water. International Journal of Environmental Analytical Chemistry, 88(13): 911–922.
- Thisse B., Pflumio S., Fürthauer M., Loppin B., Heyer V., Degrave A., Woehl R., Lux A., Steffan T., Charbonnier XQ., Thisse C. (2001): Expression of the zebrafish genome during embryogenesis (NIH R01 RR15402). ZFIN Direct Data Submission.
- Tice RR., Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., Miyamae Y., Rojas E., Ryu JC., Sasaki YF. (2000): Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. Environmental and Molecular Mutagenesis, 35(3): 206-21.

- Triqui R., Reineccius GA. (1995): Changes in flavor profiles with ripening anchovy (*Engraulis encrasicolus*) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43: 1883-1889.
- Uddameri V., Venkataraman K. (2013): Assessing the effect of initial vapor-phase concentrations on inhalation risks of disinfection-by-products (DBP) in multi-use shower facilities. *Clean Technologies and Environmental Policy*, 15(4):591-606.
- Ulker Z., Alpsoy L., Mihmanli A. (2012): Assessment of cytotoxic and apoptotic effects of benzaldehyde using different assays. *Human & Experimental Toxicology*, 32(8): 858–864.
- Urbanovszky I. (2017): *Eljárások, műveletek, berendezések a víz- és szennyvíz-technológiában*, Nemzeti Szakképzési és Felnőttképzési Hivatal, Budapest, ISBN 978 96 3264 033 4
- US NTP (2005): US National Toxicology Program, Toxicology and carcinogenesis studies of sodium chlorate (CAS no. 7775-09-9) in F344/N rats and B6C3F1 mice (drinking water studies). *National Toxicology Program Technical Report Series*, 517: 1–255.
- Walker JD., Jaworska J., Comber MH., Schultz TW., Dearden JC. (2003): Guidelines for developing and using quantitative structure-activity relationships. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 22(8):1653-65.
- Waller K., Swan S.H., DeLorenze G., Hopkins B. (1998): Trihalomethanes in drinking water and spontaneous abortion. *Epidemiology*, 1: 134-140.
- Wang P., He YL., Huang CH. (2010): Oxidation of fluoroquinolone antibiotics and structurally related amines by chlorine dioxide: reaction kinetics, product and pathway evaluation. *Water Research*, 44:5989–5998.
- Wang P., He YL., Huang CH. (2011): Reactions of tetracycline antibiotics with chlorine dioxide and free chlorine. *Water Research*, 45:1838–1846.
- Waring JF., Ciurlionis R., Jolly RA., Heindel M., Ulrich RG. (2001): Microarray analysis of hepatotoxins in vitro reveals a correlation between gene expression profiles and mechanisms of toxicity. *Toxicology Letters*, 120:359–368.
- Watson C., Ge J., Cohen J., Pyrgiotakis G., Engelward BP., Demokritou P. (2014): High-throughput screening platform for engineered nanoparticle-mediated genotoxicity using CometChip technology. *ACS Nano* 8: 2118–2133.
- Weihrauch MR., Diehl V. (2004): Artificial sweeteners--do they bear a carcinogenic risk? *Annals of Oncology*, 15(10): 1460-1465.



- Weinberg HS., Krasner SW., Richardson SD., Thruston AD. Jr (2002): The occurrence of disinfection by-products (DBPs) of health concern in drinking water: results of a nationwide DBP occurrence study. EPA/600/R02/068, Athens, GA
- WHO (1996): Benzyl acetate, benzyl alcohol, benzaldehyde, and benzoic acid and its salts. WHO Food Additives, Ser. 37:31–79.
- WHO (2002): Technical Report series 909, Evaluation of certain food additives and contaminants, pp. 73-95.
- Williams DT., LeBel GL., Benoit FM. (1997): Disinfection by-products in Canadian drinking water. *Chemosphere*, 34: 299–316.
- Williams DT., Otson R., Bothwell PD., Murphy KL., Robertson JL. (1980): Trihalomethane levels in Canadian drinking water. In: *Hydrocarbons and Halogenated Hydrocarbons in the Aquatic Environment* (pp. 503-512). Springer, Boston, MA.
- Woo YT., Lai D., McLain JL., Manibusan MK., Dellarco V. (2002): Use of mechanism-based structure-activity relationships analysis in carcinogenic potential ranking for drinking water disinfection by-products. *Environmental Health Perspectives*, 110(suppl 1):75-87.
- Wu J., Chongyu L., Sing Chan GY. (2009): Organophosphorous pesticide ozonation and formation of oxon intermediates. *Chemosphere*, 76:1308–1314.
- Ye L., Li F., Song Y., Yu D., Xiong Z., Li Y., Shi T., Yuan Z., Lin C., Wu X., Ren L. (2018): Overexpression of CDCA7 predicts poor prognosis and induces EZH2-mediated progression of triple-negative breast cancer. *International Journal of Cancer*, 143(10):2602-2613.
- Žegura B., Filipič M. (2004): Application of in vitro comet assay for genotoxicity testing. In *Optimization in Drug Discovery*, Humana Press, pp. 301-313.
- Zhao Y., Qin F., Boyd JM., Anichina J., Li XF. (2010): Characterization and determination of chloro- and bromo-benzoquinones as new chlorination disinfection byproducts in drinking water. *Analytical Chemistry*, 82: 4599-4605.
- http1: <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/drinking-water>
- http2: [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/diseases-risks/diseases/diarrhoea/en/](http://www.who.int/water_sanitation_health/diseases-risks/diseases/diarrhoea/en/)
- http3: <http://www.asuranagroup.com/product/drinking-water-treatment>
- http4: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/4ethylbenzaldehyde13418474878111?lang=hu&region=HU>

## M2 Ábrák és táblázatok jegyzéke

1. ábra Az ivóvíz kezelésének sematikus ábrája (http3 alapján).....	13
2. ábra A 4-etilbenzaldehyd szerkezeti képlete.....	28
3. ábra A 2,4-difluoroanilin szerkezeti képlete.....	31
4. ábra Az EFSA által ajánlott genotoxicitás vizsgálati stratégia (Glei et al. 2016 alapján) .....	36
5. ábra A DNS-microarray módszere, Lettieri (2005) alapján A, Egyszínű jelölést alkalmazó array kivitelezésének fő lépései B, Kétszínű jelölést alkalmazó array kivitelezésének fő lépései	44
6. ábra A comet assay főbb lépései (Tan & Bajo 2014 alapján).....	49
7. ábra (A) A farok regenerációs vizsgálat kivitelezésének sematikus ábrája (B) A farok lemetszésének sematikus ábrája (d0: sebzést követő kiindulási távolság; dn: az aktuális lement távolság; Δl: az aktuálisan regenerálódott szakasz hossza) .....	52
8. ábra A 2-4-difluoroanilin mortalitásra vonatkozó dózis-hatás görbéi (120 órás embrió teszt)	54
9. ábra A 2,4-difluoroanilin által okozott fenotípusos elváltozások (PE- perikardiális ödéma, YC- elszíneződött szik, TC- farok görbület, TM- faroktorzulás) .....	55
10. ábra A 4-etilbenzaldehyd mortalitásra vonatkozó dózis-válasz görbéi .....	56
11. ábra A 4-etilbenzaldehyd által okozott fenotípusos elváltozások (PE- perikardiális ödéma, YC- elszíneződött szik, TC- farok görbület, TM- faroktorzulás, HM- fejtörzés).....	57
12. ábra A 4-etilbenzaldehyd által okozott fenotípusos elváltozások és a mortalitásra vonatkozó dózis-válasz görbe a 96-120 hpf expozíciós ablakban (PE- perikardiális ödéma, YC- elszíneződött szik, BS- elmosódott testszegmensek, HM- fejtörzés) .....	58
13. ábra Az EBA által indukált transzkripció változások 120 hpf zebradánió embriókban. (A) 120 hpf zebradánió lárvák mRNS transzkriptomjának két dimenziós főkomponens analízise, minden EBA által regulált mRNSre ( $p \leq 0,05$ , $FC \geq 2$ ). (B) Az EBA által szabályozott szabályozott génexpressziós klaszterek megjelenítése boks-plot ábrán ( $p \leq 0,05$ , $FC \geq 2$ ) (C) Az EBA által leginkább befolyásolt 5 biológiai funkció klaszterenként.....	60
14. ábra A sejtproliferációval kapcsolatos génhálózat 120 hpf zebradánió embriókban. (A) A GeneMANIA-val azonosított csökkent expressziót mutató, sejtproliferációval kapcsolatos génhálózat (B) Hőterkép, amely a sejtciklushoz kapcsolódó gének átlagos normalizált jelintenzitását mutatja a kontroll és az EBA-val kezelt 120 hpf zebradánió lárvákban.....	61
15. ábra EBA által indukált DNS károsodás 24 hpf zebradánió embrióknál. A csillaggal jelölt csoportokban szignifikánsan magasabb volt a DNS töredezettség mértéke (Kruskal-Wallis teszt, $H=978,714$ , $df=10$ , $p < 0,00001$ ) A K20 jelöli a 20 mg/l koncentrációval, K40 jelöli a 40 mg/l Luperox-szal kezelt pozitív kontroll csoportot. ....	62
16. ábra Az EBA kezelés hatására kialakult mikronukleuszok száma. A csillaggal jelölt csoportokban a kialakult mikronukleuszok száma szignifikánsan magasabb, mint a kontroll csoportban ( $p < 0,05$ ) .....	63
17. ábra: Az EBA regenerációs képességre gyakorolt hatásának vizsgálata zebradánió farokúszó regenerációs kísérletben. (A) Az alkalmazott farokúszó lemetszéses módszer kivitelezésének sematikus ábrája (B) A farokúszó regeneráció kvantifikálásának sematikus ábrája (C) A regenerálódott farokúszó hossz (Δl) az idő függvényében a metszés után (hpf) a kontroll csoportokban, valamint az EBA-val kezelt csoportokban ( $n \geq 30$ , átlag+szórás). *** $P < 0.001$ , **** $P < 0.0001$ ; n.s. nem szignifikáns) (D): A farokúszókról készült fotók a metszés időpontjában és a kezelés 72. órájában. ....	65
18. ábra A benzaldehyd metabolizációja és hatása a sejttanyagcserére (Ulker et al. 2012 alapján) .....	73

1. táblázat A legismertebb, ivóvízben előforduló, megbetegedéseket okozó baktérium törzsek Crittenden et al. (2005) nyomán.....	10
2. táblázat Néhány fontosabb vízparaméterre vonatkozó határérték az MSZ 450/1-1989 szabvány, valamint a 201/2001. Kormányrendelet alapján.....	15
3. táblázat Az EPA, az EU és a WHO által megállapított irányadó határértékek a leggyakrabban és legnagyobb mennyiségben előforduló víztisztítási melléktermék vegyületekre vonatkozóan.	16
4. táblázat A 120 órás embrió tesztek során alkalmazott kezelési koncentrációk.....	47
5. táblázat A lízis oldat összetétele.....	50
6. táblázat A 2-4-difluoroanilin LC <sub>50</sub> értékei az expozíciós idők függvényében.....	54
7. táblázat A 4-etilbenzaldehyd LC <sub>50</sub> és LC <sub>10</sub> értékei az expozíciós idők függvényében .....	56
8. táblázat EBA által indukált genomkárosodás miatt kialakult mikronuklesz szám meghatározásának eredményei. A kezelt csoportok és a kontrol közötti szignifikáns eltérést csillag jelzi (*) (P<0.05).....	63

## 11. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani minden kollégámnak, akik az elmúlt években segítettek a munkámat. Köszönettel tartozom témavezetőmnek, **Dr. Csenki-Bakos Zsolt Imrének**, aki mint témavezető és barát mellett állt és tanácsaival, iránymutatásával segítette a kutatásaimat és szakmai fejlődésemet úgy a graduális, mint a PhD képzés során.

Köszönetet mondok társtémavezetőmnek, **Dr. Urbányi Bélának**, hogy nem csupán a PhD képzés, de az egyetemi tanulmányaim alatt is lehetővé tette és segítette kutatásaimat és szakmai fejlődésemet. Tanácsaival, tapasztalataival segítette munkámat.

Köszönettel tartozom a zebradániós laboratórium volt és jelenlegi munkatársainak, **Gazsi Gyöngyinek, Csepeli Andreának, Kövesi Juditnak, Garai Edinának** a kísérleteim lebonyolításában nyújtott segítségükért, **Dr. Kovács Róbertnek** szintén a kísérletek kivitelezésében nyújtott segítségével és szakmai tanácsaiért, a sokévnnyi közös munkáért és barátságért.

Köszönettel tartozom **Dr. Csenki-Bakos Katalinnak** a molekuláris biológiai vizsgálatok tervezésében és kivitelezésében és a módszerek elsajátításában nyújtott segítségével és, hogy barátként is mindenben számíthattam és számíthatok rá.

Köszönetet mondok **Dr. Czimmerer Zsoltnak** a transzkriptom analízis elkészítésében és a farokregenerációs vizsgálat kivitelezésében nyújtott segítségével, továbbá **Ivánovics Bencének**, szintén ezekben a vizsgálatokban nyújtott segítségével.

Köszönettel tartozom **Dr. Ferincz Árpádnak** és **Dr. Staszny Ádámnak**, hogy segítettek a statisztikai elemzések elkészítésében és eligazodni a statisztika világában.

Szeretnék köszönetet mondani **Dr. Goran Gajskinak** és **munkatársainak** a mikronukleusz teszt kivitelezésében és elemzésében nyújtott segítségükért.

Köszönet illeti **Dr. Stefan Sholz**-ot és **Dr. Fetter Évát**, akikkel a Lipcsében található Helmholtz Intézetben volt szerencsém a microarray vizsgálat kivitelezésére, tanácsaikkal és tapasztalataikkal nagyban hozzájárultak munkám sikeréhez.

Szeretnék köszönetet mondani továbbá **Dr. Szende Béla** professzor úrnak és **Dr. Ráczi Gergelynek**, hogy megosztották velünk a víztisztítási melléktermékekkel kapcsolatos eredményeiket.

Köszönetet szeretnék mondani egykori kiváló hallgatóimnak, **Hajós Zsuzsannának** és **Varga-Kanizsai Barbarának**, akik szintén segítségemre voltak a vizsgálatokban.

Köszönet illeti a **Halgazdálkodási Tanszék dolgozóit**, akikhez mind egyetemi, mind pedig doktorandusz éveim alatt fordulhattam tanácsért. Külön köszönetet szeretnék mondani első konzulensemnek, **Dr. Szabó Tamásnak**, hogy megismertette és megszerettette velem a halakat és a halgazdálkodást.

Szeretném megköszönni jelenlegi munkahelyem, a **Szegedi Tudományegyetem Mérnöki Kar** vezetésének, és az **Élelmiszermérnöki Intézet munkatársainak**, hogy támogató közegben írhattam meg dolgozatomat. Kiváltképp köszönöm a támogatást **Dr. Biró István Dékán Úrnak**, **Hovorkáné Dr. Horvát Zsuzsanna Dékánhelyettes Asszonynak**, **Dr. Gál József Dékánhelyettes Úrnak**, **Dr. Véha Antal Intézetvezető Úrnak**. Külön köszönet **Dr. Szabó P. Baláznak**, **Dr. Zsarnóczay Gabriellának** és **Mihalkó Józsefnek** a támogatásért és a töretlen jókedvéért.

Köszönöm a barátaimnak, **Rácz-Bilics Andreának** és **Rácz Tibornak**, **Lestyán Anitának** és **Hermann Péternek**, **Zsák Péterné Szabó Kittinek** és **Zsák Péternek**, **Bencsik Imrének** és **Bodnár Zsuzsannának**, hogy bátorítanak és mindenben mellettem állnak.

Végül, de nem utolsó sorban szeretnék köszönetet mondani **Édesanyámnak** és **Édesapámnak** a rengeteg támogatásért és ösztönzésért, amit kaptam és kapok tőlük minden nap. Továbbá testvéreimnek, **Baláznak** és feleségének, **Júliának**, **Tamásnak** és feleségének, **Renátának**, hogy mindig, mindenben számíthatok rájuk. Köszönöm a támogatást nagyszüleimnek, keresztszüleimnek és az egész családomnak.

Hatalmas köszönet illeti kedvesemet, **Szepesi Csabát**, hiszen mindig, mindenben mellettem áll, támogat céljaim elérésében, végtelenül türelmes velem és a maga sajátos módján ösztönöz.

Aki nélkül azonban ez a munka tényleg nem jött volna létre, mert jókor lendített át a mélypontra, és ezért örökre hálás leszek neki, **Dr. Alexy Márta**.

A munkát az alábbi pályázatok támogatták: EFOP-3.6.3- VEKOP-16-2017-00008, TUDFO/51757/2019-ITM, DAAD 29836, DAAD 65134, NVKP-16-1-2016-0023, NVKP\_16-1-2016-0003.