

Animal welfare, etológia és tartástechnológia



Animal welfare, ethology and housing systems

Volume 15

Issue 1

Gödöllő
2019

EGY VÍZTISZTÍTÁSI MELLÉKTERMÉK, A 3-AMINO-9-ETILKARBAZOL ÁLTAL KIVÁLTOTT DEFEKTUSOK FELDERÍTÉSE TOXIKOLÓGIAI MÓDSZEREKKEL A ZEBRADANIÓ (*DANIO RERIO*) KORAI ÉLETSZAKASZÁBAN

Balogh Erna, Berta Roberta, Gazsi Gyöngyi, Garai Edina, Reining Márta, Urbányi Béla, Bakos Katalin, Csenki Zsolt

SZIE Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet
2100 Gödöllő, Páter Károly utca 1.
balogh.erna@mkk.szie.hu

Received – Érkezett: 05. 06. 2018.
Accepted – Elfogadva: 14. 11. 2018.

Összefoglalás

Vizsgálataink fő célja egy víztisztítási melléktermék, a 3-amino-9-etilkarbazol (3A9EC) akut és szub-krónikus toxikus hatásainak felderítése volt zebra-danió modellszervezeten.

Az elsődlegesen alkalmazott teszt egy módosított OECD 236-os embriótoxikológiai vizsgálat volt, amivel az anyag általános toxikus hatásait lehet tanulmányozni. Az eredmények alapján elkészítettünk egy négy napos expozíció utáni LC (letális koncentráció) görbét, valamint meghatároztuk a hozzá tartozó LC₅₀ illetve LC₁₀ értékeket. A teszt során a mortalitás mellett a különböző szubletális tüneteket is megfigyeltük.

A kapott akut eredmény alapján a kísérletek második szakaszában a vizsgált anyag szubkrónikus hatásait vizsgáltuk egy 33 napig tartó vizsgálat során. A két alkalmazott koncentrációt az OECD 236-os tesztje alapján kapott 72 órás LC₁₀ érték alatt határoztuk meg. A teszt végére csak az alacsonyabb koncentráció esetén maradtak életben egyedek, melyek mindegyikén megfigyelhetők voltak méretbeli különbségek és jellemző volt a pigmenthiány a kontroll csoporthoz viszonyítva.

A vizsgálatokat három transzgenikus zebra-danió vonalon folytattuk. A teszt során megfigyelhető volt a 3A9EC ér- és idegrendszer, valamint vese károsító hatása a lárvák 72 órás állapotában.

Az eredmények toxikológiai szempontból komplex információt szolgáltatnak a 3A9EC víztisztítási melléktermékekkel kapcsolatban, valamint megállapítható, hogy szükséges az anyag további toxikológiai vizsgálata, mert hosszan tartó fogyasztása káros lehet az élő szervezetekre, így az emberre is.

Kulcsszavak: víztisztítási melléktermék, toxikológia, zebra-danió

Investigation of effects caused by water disinfection byproduct (3-Amino-9 ethylcarbazole) on zebrafish using toxicological tests and gene expression analysis

Abstract

The aim of this study was the investigation of toxic effects of 3-Amino-9 ethylcarbazole (3A9EC) water disinfection byproduct. Tests were carried out according to the modified OECD

(Organisation for Economic Cooperation and Development) guideline (No. 236) in order to detect the acute and sub-chronic toxic effects of 3A9EC.

At the end of exposure, LC50 and LC10 values for embryo mortality were determined.

Next, a subchronic assay of 33 days was conducted to study the lethal and sub-lethal effects of 3A9EC on the early life stage of zebrafish. On the basis of acute test results, embryos were exposed to two test concentrations below the 72h LC₁₀. At the end of the test, only those individuals survived which were treated with the lower concentrations of 3A9EC. Treated embryos showed developmental malfunctions, differences in size and depigmentation compared to the control group.

To observe vascular and nervous system effects, experiments were conducted on three transgenic zebrafish lines. Impairments were only detected in 72 hours post fertilization (hpf) larvae.

However results provide complex information on the toxic effects of 3A9EC, it seems that the substance could be potentially harmful to living organisms including humans, so further experiments are needed.

Keywords: zebrafish, toxikology, water disinfection byproduct

Irodalmi áttekintés

A megfelelő minőségű ivóvíz nélkülözhetetlen az emberi szervezet számára. Az ivóvíz megfelelő minőségének elérése érdekében a legfontosabb lépés a fertőtlenítés, mivel az emberre káros mikroorganizmusok csak így pusztíthatók el, azonban az eljárás során különböző emberi egészségre veszélyes víztisztítási melléktermékek keletkeznek. A klór és vegyületei hozzáadásával történő fertőtlenítés az egész világon széles körben elterjedt, költséghatékony vízfertőtlenítési módszer (*Cantor és mtsai*, 1988).

A fertőtlenítés során keletkező vegyületeknek a számát hatszáz felettire becsülik (*Richardson*, 2002), melyek közül csak kevés anyag toxikológiai vizsgálatát kezdték meg, így nem lehet minden anyagra határértéket bevezetni. A víztisztítási melléktermékek esetében is úgynevezett „jelző” vegyületekre állapítottak meg határértékeket, melyek többnyire vegyület csoportjuk legnagyobb mennyiségben jelen lévő képviselői. Azonban vannak olyan vegyületek, melyek nem esnek szabályozás alá, ezek között szerepelnek jódos savak, bromo-nitrometánok, jodo-trihalometánok, halofuranonok, halopirrolok, halokinonok, haloamidok, haloaldehidek, halonitrilek és nitrózaminok (*Woo és mtsai*, 2002). A melléktermékek hatásának az emberi szervezet egész élete folyamán ki van téve. Bekerülhet a szervezetbe szájon keresztül, bőrön át illetve belélegzés útján (*Lin és mtsai*, 2000). Ezek a vegyületek reprodukciós képességet befolyásoló, mutagén vagy karcinogén hatásúak is lehetnek, ezért nagyon fontos a vizek minőségének vizsgálata. A kémiai vizsgálatok mellett szükséges a biológiai tesztek alkalmazása is (*Nieuwenhuijsen és mtsai*, 2009).

A víztisztítás során keletkező melléktermékek kapcsán felmerülő veszélyek vezettek a vegyületekkel kapcsolatos további kutatásokhoz, melyekben *in vivo* és *in vitro* toxikológiai modelleket alkalmaznak. Laboratóriumi halakat széles körben alkalmaznak a biológia és az orvostudomány különböző területein, valamint a toxikológiai tesztek során (*Berghmans és mtsai*, 2005). A legtöbb vegyület, amely rákkeltő rágszálókban és emberben, látható tumor képződést okoz halakban, és az okozott rosszindulatú daganatok gyakran ugyan ott jelennek meg, mint más fajokban (*Simon és Lapis*, 1984). A kedvező biológiai jellemzők miatt a zebradánió (*Danio rerio*) a leggyakrabban használt halfaj a toxikológiai tesztekben. Hormonhatású anyagok és anyagkeverékek káros hatásainak vizsgálatára is egyre többször alkalmaznak transzgenikus vonalakat. A transzgenikus vonalak alkalmazásával lehetőség nyílik egy anyag bizonyos szervekre

kifejtette toxikus hatásának vizsgálatára. Vizsgálható egy anyag ér- és idegrendszer, vese és májkárosító hatása. Alkalmazásukkal pontosabb információkat kaphatunk egy-egy vegyület *in vivo* hatásáról.

Mivel az általunk választott víztisztítási melléktermék hatása jelenleg teljesen ismeretlen, vizsgálatom célja, a 3-amino-9-etilkarbazol hatásának felderítése volt, különböző toxikológiai módszerek alkalmazásával.

Anyag és módszer

Kísérleti állomány bemutatása és tartási körülményei

A beoldási vizsgálatok során, úgy tapasztaltuk, hogy a 3-amino-9-etilkarbazol (3A9EC) nem oldódik jól vízben, azonban dimetil-szulfoxid (DMSO) oldószer alkalmazásával fel tudtuk oldani. Vizsgálatainkhoz egy vad típusú AB, valamint három különböző transzgenikus vonalat alkalmaztunk. Az anyahalakat állandó átfolyást biztosító recirkulációs rendszerben, 10 óra sötét és 14 óra világítási ciklusban tartjuk (ZebTec, Tecniplast Inc.). Ivar szerint szétválogatva 3 literes medencékbe 30-30 egyed kerül elhelyezésre. A víz $25\pm 0,5$ °C-os, a pH $7,4\pm 0,2$, a vezetőképesség 525 ± 50 μ S volt. Napi kétszer kapnak száraz tápot, illetve hetente két alkalommal sórákot (*Artemia salina*).

Vad típus, kifejezetten laboratóriumi vizsgálatokra előállított állomány, mely a Streisinger által használt állomány utódaiból származik. Ahhoz, hogy a vonal megbízhatóan használható legyen laboratóriumi vizsgálatokra, mentesíteni kellett bizonyos betegségektől és letális mutációktól, melyet több különböző speciális keresztezési eljárás által értek el. Így alakult ki a ma világszerte alkalmazott különféle laboratóriumi vizsgálatokra alkalmas AB vonal.

Az egyik kettős transzgenikus vonalat a következő konstrukciókkal hozták létre: a GATA-1 transzkripció faktor promóter régióját vörös fluoreszcens fehérjét (DsRed) kódoló gén elé építették (Yaqoob és mtsai, 2009); a zöld fluoreszcens fehérjét kódoló gént (GFP) elé pedig a Fli-1 gén transzkripció start helyét építették (Lawson és Weinstein, 2002). A vörös fluoreszcens jel a vérsejteket jeleníti meg, a zöld fluoreszcens jel pedig az érfalat. A transzgenikus vonal segítségével jól vizsgálható a különböző anyagok vérképző szervekre és vérsejtekre gyakorolt hatása.

A másik két fluoreszcens fehérjét egy időben hordozó vonalban a zöld fluoreszcens fehérjét kódoló szakasz előtt a neurogenin-1 gén promóter régiója és a szabályozó szekvenciája van, míg a vörös fluoreszcens fehérjét kódoló szakasz előtt a nesztin gén promóter régiója. Mivel a transzgenikus vonalban a vörös és/vagy zöld fluoreszcens fehérje az idegszövetben fejeződik ki, jól használható toxikus anyagok idegszövetre kifejtett káros hatásainak *in vivo* vizsgálatára. Az osztódó idegsejteket jelöli a vörös riportergén. A neurogenin-1 gén az idegi lemez kialakulása során az elsődleges neurogenesis, a primer neuronok differenciálódásának helyét jelzi, halakban komplex mintázatot mutat. (Blader és mtsai, 2002).

A Wilm's tumor szupresszor gén (WT1) egy cink-finger transzkripció faktor kódol, amely elsősorban a vese fejlődésében játszik fontos szerepet. A harmadik általunk alkalmazott vonalban a WT1 és WT2 szabályzó régiókhöz kapcsolt zöld fluoreszcens fehérje segítségével vese-specifikus transzgenikus vonalat hoztak létre. A zöld riportergén a kopoltyút és a vesét jeleníti meg. A vonal segítségével a vesében bekövetkező elváltozások figyelhetők meg (Bollig és mtsai, 2009).

FET (Fish Embryo Acute Toxicity, No. 236)

Az alkalmazott teszt egy módosított OECD 236-os számú Fish Embryo Acute Toxicity Test (FET) volt (OECD 2013), amivel az anyagok általános toxikus hatásait lehet tanulmányozni. A teszt elvégzéséhez frissen megtermékenyült vad típusú AB vonalból származó ikrákat használtunk, amelyeket egy 24 lyukú szövettenyésztő plate-be helyeztünk úgy, hogy egy lyukba egy embrió került.

Koncentrációként 20 egyeddel dolgoztunk. A vizsgálat alatt az embriókat inkubátorban tartottuk, 25,5 °C-on, 72 órán keresztül. A teszt során alkalmazott koncentrációk az alábbiak voltak: 1 mg/l; 2 mg/l; 2,5 mg/l; 3 mg/l; 3,5 mg/l; 4 mg/l; 4,5 mg/l; 6 mg/l; 8 mg/l. A teszt közben nem csak a mortalitást figyeltük, hanem a 72. órában feljegyeztük az esetleges tüneteket is. Ennek vizsgálata egy fénymikroszkóp (LEICA M250FA, 20x, 21,0ms) segítségével történt, amivel a 72. órában fényképeket készítettünk az egyedekről. A teszt eredményeként dózis hatás görbét készítettünk a GraphPad Prism 6.01 szoftver segítségével, amivel meg tudtuk határozni az LC₅₀ és az LC₁₀ értékeket a 72. órában.

Hosszú távú vizsgálat

A vizsgálat során irányadó volt az OECD szabvány. A teszt elvégzéséhez vad típusú AB vonalból származó ikrákat használtunk. A következő alkalmazott vizsgálatnál egy 33 napig tartó tesztet végeztünk, amivel a letális és a szubletális hatásokat tudtuk vizsgálni az adott tesztszervezet korai életszakaszára. A teszthez frissen megtermékenyült és ép ikrákat használtunk és a teszt a keléstől számított 30 napig tartott.

A két alkalmazott koncentrációt (2 mg/l és 0,25 mg/l) a FET teszt alapján kapott 72 órás LC₁₀ érték segítségével határoztuk meg, mely egy OECD szabvány 210-es számú teszt szerinti két végpontot jelöl. A kezelt csoportok mellett volt egy kontroll és egy oldószeres (DMSO) kontroll is. Csoportonként két ismétlésben, 50-50 ikrával indítottuk a kísérletet és napi oldatcserét alkalmaztunk. A kezelés első 5 napján 5 cm-es Petriben történt a nevelés, majd 10 cm-es Petribe helyeztük őket. A 11. kezelési napon pedig 1 literes szaporító edényekbe folytattuk a vizsgálatot. Az egész kísérlet alatt inkubátorba tartottuk az ikrákat, 25,5 °C -on. A teszt alatt a kísérleti állomány főreg és kisméretű haltáp keverékét kapta.

Traszgenikus vonalakon végzett kísérletek

A vizsgálatba a korábban említett három traszgenikus vonalat vontunk be, hogy felderítsük mi okozta a hosszú távú tesztnél a 2 mg/l-es kezelési koncentráció hatására a korai elhullást, mivel fenotípusos elváltozást nem láttunk. A különböző vonalakkal azt vizsgáltuk, hogy látható-e szervi elváltozás a kezelés hatására. A három választott koncentrációt a korábbi teszt alapján választottuk ki. A legmagasabb koncentrációt (4 mg/l) úgy választottuk, hogy már láttunk a FET-teszt során a kezelés hatására kialakuló fejlődési rendellenességet, a másik két kezelési koncentrációt (2 mg/l, 1 mg/l) pedig a hosszú távú teszt eredményei alapján. A teszthez frissen megtermékenyült és ép ikrákat használtunk és a teszt a keléstől számított 72 óráig tartott. Az eredményeket vizuálisan értékeltük.

Eredmények és értékelés

FET-teszt eredménye

A kontroll és oldószeres kontroll csoportban tartózkodó egyedek között nem történt pusztulás a 72. óráig, valamint a képen is jól látható, hogy az egyed fejlettségi szintje megfelelő és nem figyelhető meg torzulás az állatokon. Az anyag hatása azonban már a legkisebb kezelési koncentráció esetében megfigyelhető volt. A magasabb koncentráció felé haladva egyre több fejlődési rendellenességet detektáltunk. A vizsgálat során, az egyedeken pigmenthiány, sziködéma, hematóma, valamint fej és fark torzulás volt megfigyelhető (1. ábra).

A 3A9EC anyaggal elvégzett FET-teszt alapján dózis-hatás görbét készítettünk, amin az adott koncentrációhoz tartozó mortalitást ábrázoltuk a 72. órában (2. ábra). Az eredmények alapján számított 72 órás LC₅₀ érték $3,891 \pm 0,265$ mg/l volt, míg az LC₁₀ érték pedig $2,154 \pm 0,254$ mg/l.

1. ábra: Kezelet embriók mikroszkópos képe: A 3A9EC FET-tesztje során a 72. órában készített képek



Figure 1: Images of treated larvae: Images of larvae after treated by 3A9EC during FET test in 72nd hour

2. ábra: Dózis-hatás görbe: FET-teszt eredményeként kapott letális koncentráció görbe a 72. órában (3A9EC)

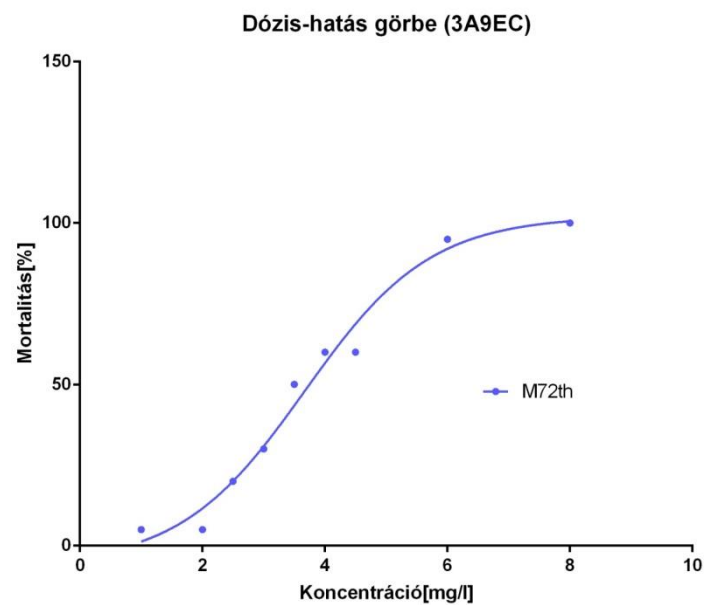


Figure 2: Dose-response curve: Lethal concentration curve in 72nd hour based on results of FET test (3A9EC)

Hosszú távú vizsgálat eredménye

A további vizsgálatokhoz a FET-teszt alapján számolt 72 órás LC₁₀ (2,154 ± 0,254 mg/l) értékre alapozva határoztuk meg a 33 napos teszt során alkalmazott koncentrációkat (2 mg/l, 0,25 mg/l). A 33 nap során minden nap feljegyeztük, hogy az adott napon hány egyed pusztult el. A kontroll csoportban és az oldószeres kontroll csoportban az összes elhullás a kelést követő 30 nap alatt nem érte el a 20 %-ot. A kezelési csoportokban csak az alacsonyabb koncentráció esetében maradtak életben egyedek (72%) a teszt végére. A 2 mg/l esetében pedig már a 6. napon elpusztult minden egyed (3. ábra). Az életben maradt kezelt egyedek mérete kisebb volt a kontroll csoport egyedéhez viszonyítva, valamint jellemző tünet volt a pigmenthiány.

3. ábra: Hosszú távú teszt: 33 napos teszt napi pusztulása (3A9EC)

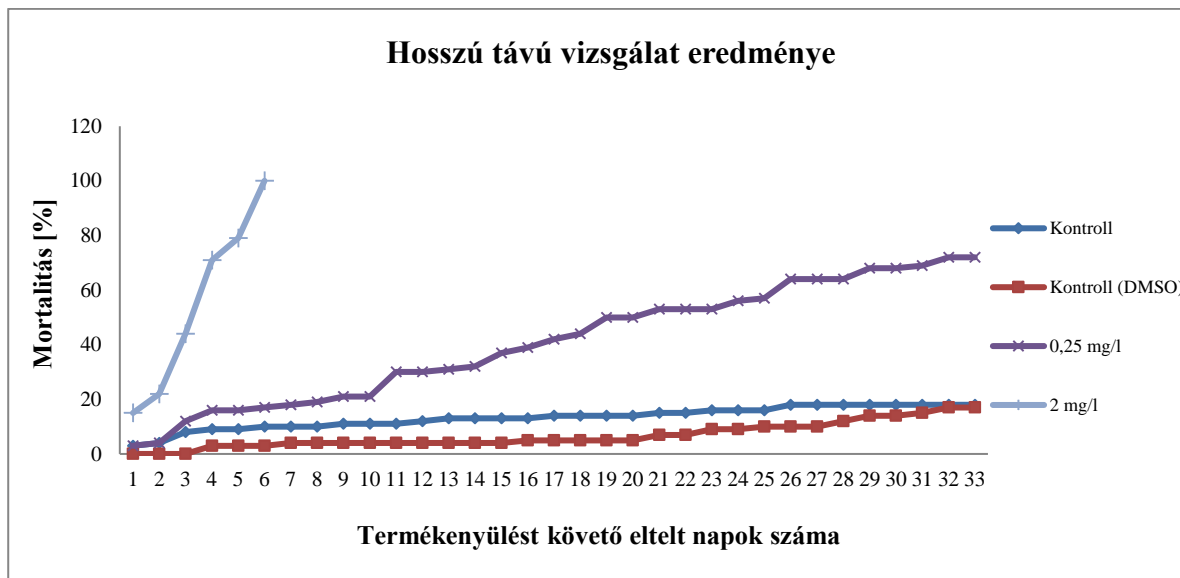


Figure 3: Long-term test: Daily mortality during 33-day test

Transzgenikus zebradánió vonalakon végzett kísérletek eredménye

A kísérletek során olyan kezelési koncentrációkat alkalmaztunk, melyek a korábbi vizsgálatokban (FET) fejlődési rendellenességeket okoztak. A vizsgálat folyamán megfigyelt elváltozásokat a 4. ábra mutatja, melyeket vizuális kiértékelés alapján kaptunk. A vér és érrendszer transzgenikus egyedek vizsgálata során az anyag két magasabb koncentrációja esetében figyeltünk meg nagyobb elváltozásokat. Elsősorban a feji részen keletkeztek kisebb-nagyobb kiterjedésű vérömlenyek, valamint a szelvény közötti erek egy része a vörsejtek számára nem volt átjárható. A központi idegrendszer morfológiájában nem találtunk eltérést, azonban az agyban az osztódó sejteket jelölő vörös fluoreszcens jel erőssége bizonyos területeken magasabb volt a kontroll csoportban észlelt jel erősségéhez viszonyítva. A vese-transzgenikus vonalon a két magasabb koncentráció esetében, a riporter gén kifejeződésének csökkenése volt megfigyelhető a kopoltyúíveken.

4. ábra: Transzgenikus embriókon végzett vizsgálatok eredményei (3A9EC)

3A9EC	4 mg/l	2 mg/l	1 mg/l
vérömlenyek kialakulása	X	X	
érfejlődési zavarok	X	X	X
eltérés az osztódó idegsejtek számában	X	X	X
vesefejlődési rendellenességek	X	X	

Figure 4: Results of transgenic embryos treated by 3A9EC

Következtetések és javaslatok

A FET-teszt során, már a legalacsonyabb koncentrációnál (1 mg/l) megfigyelhető volt enyhe pigment hiány, mely a magasabb koncentráció felé haladva egyre fokozódott. A vizsgálat folyamán számos fenotípusos elváltozás volt megfigyelhető már az alacsony koncentrációknál is. Az anyag hosszú távú vizsgálata során annak ellenére, hogy LC₁₀ érték alattiak voltak a kezelési koncentrációk, csak az egyik kezelt csoportban maradtak életben egyedek. Ennek oka feltehetően az anyag hatására a szervekben bekövetkező károsodás, melyek fenotípusos elváltozásként a hosszú távú teszt során nem voltak láthatóak, a vizuális értékelés során. Ezen feltételezés alátámasztása érdekében vontuk be a vizsgálatokba a transzgenikus vonalakat.

A transzgenikus vonalon végzett vizsgálatok alapján megállapítható, hogy az anyag kedvezőtlenül befolyásolja az ér- és idegrendszer fejlődését, valamint a vese transzgenikus vonalon is megfigyelhető volt a kezelés hatása. Az idegrendszer esetében sejtosztódást befolyásoló hatás volt megfigyelhető. A transzgenikus vonalak közül csak a neurogenin-nesztin vonal alkalmas a megfelelő sejtosztódás vizsgálatára, azonban ez nem jelenti azt, hogy a sejtosztódás megváltozása csak ezt a szövetet érinti, ezért további vizsgálat szükséges.

Az eredmények alátámasztása érdekében molekuláris vizsgálatot fogunk elvégezni qPCR segítségével, ahol olyan géneket fogunk vizsgálni, amelyek fontos szerepet töltenek be az egyes szervek megfelelő fejlődése és működése során. Tervezzük továbbá, egy bővített 33 napos teszt elvégzését, további három kezelési csoport bevonásával, melyet már az OECD 210-es számú szabvány alapján fogunk elvégezni. Ez a vizsgálat alkalmas egy ismeretlen hatású anyag letális és szubletális hatásának értékelésére.

Az eredmények alapján megállítható, hogy szükséges az anyag további vizsgálata, mert hosszan tartó fogyasztása káros lehet az élő szervezetekre, így az emberre is.

Irodalomjegyzék

- Berghmans S. Jette C., Langenau D., Hsu K., Stewart R., Look T., Kanki J.P. (2005): Making waves in cancer research: new models in the zebrafish. *Biotechniques* 39:227–237
- Blader P., Plessy C., Strahle U. (2002): Multiple regulatory elements with spatially and temporally distinct activities control neurogenin1 expression in primary neurons of the zebrafish embryo. *Mechanisms of Development* 120 (2003) 211–218 p.
- Bollig F., Perner B., Besenbeck B., Köthe S., Ebert C., Taudien S. and Englert C. (2009): A highly conserved retinoic acid responsive element controls, *Development* 136, 2883–2892 (2009) doi:10.1242/dev.031773

- Cantor K.P., Lynch D.F., Hildesheim M.E., Dosemeci M., Lubin J., Alvanja M., Craun G. (1988):* Drinking water source and chlorination byproducts, Risk Bladder Cancer. *Epidemiol.* 9, 21–28.
- Héjjas I. (2013):* Az élet megóvása és a környezetvédelem, *Czupi Kiadó, Nagykanizsa, 35. p., 89-90 p.*
- Kolpin D.W., Skopec M., Meyer M.T., Furlong E.T., Zaugg S.D. (2004):* Urban contribution of pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants to streams during differing flow conditions. *Sci. Total Environ.* 328 (1–3), 119–130.
- Lawson N. D. & Weinstein B. M. (2002)* In Vivo Imaging of Embryonic Vascular Development Using Transgenic Zebrafish. *Developmental Biology* 248, 307–318 p.
- Lin, Tsair-Fuh, Shih-Wen Hoang. (2000):* Inhalation exposure to THMs from drinking water in south Taiwan. *Science Total Environment.* 246:41-49.
- Nieuwenhuijsen M.J., Toledano M.B., Elliott P. (2000):* Uptake of chlorination disinfection by-products; a review and a discussion of its implications for exposure assessment in epidemiological studies. *J Expo Anal Environ Epidemiol* 10:586–599
- OECD (2013):* Guidelines for testing of chemicals. Effects on biotic systems.
- Richardson SD. (2002):* The role of GC-MS and LC-MS in the discovery of drinking water disinfection by-products. *Environmental Monitoring.* 4(1):1-9.
- Simon K., Lapis K. (1984):* Carcinogenesis studies on guppies. *Natl Canc Inst Monogr* 65:71–81
- Yaqoob N., Holotta M., Prem C., Kopp R., Schwerte T. (2009):* Ontogenetic development of erythropoiesis can be studied non-invasively in GATA-1:DsRed transgenic zebrafish *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 154 (2009) 270–278 p.