



Szent István Egyetem

UV-szűrők és az  $5\alpha$ -dihidrotesztozteron, mint vízszennyező  
vegyületek káros hatásai és biotetoxifikációja

Balázs Adrienn

Gödöllő

2018

## **A doktori iskola**

**megnevezése:** Környezettudományi Doktori Iskola

**tudományága:** Környezettudomány

**vezetője:** Csákiné Dr. Michéli Erika  
egyetemi tanár, az MTA doktora  
SZIE, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar  
Talajtani és Agrokémiai Tanszék

**Témavezető:** Dr. Kriszt Balázs  
egyetemi docens, PhD  
SZIE, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar  
Környezetbiztonsági és Környezettoxikológiai Tanszék

**Társtémavezető:** Dr. Krifaton Csilla  
egyetemi adjunktus, PhD  
SZIE, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar  
Környezetbiztonsági és Környezettoxikológiai Tanszék

.....  
Az iskolavezető jóváhagyása

.....  
A témavezető jóváhagyása

## TARTALOMJEGYZÉK

1.	JELÖLÉSEK, RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	5
2.	BEVEZETÉS .....	8
3.	IRODALMI ÁTTEKINTÉS .....	10
3.1.	A hormonrendszer és a hormonháztartást megzavaró vegyületek .....	10
3.2.	Természetes eredetű hormonháztartást megzavaró vegyületek.....	11
3.2.1.	5 $\alpha$ -dihidrotesztozteron (DHT).....	11
3.3.	Mesterséges eredetű hormonháztartást megzavaró vegyületek.....	14
3.3.1.	Benzofenon-3 (BP-3) .....	16
3.3.2.	4-metilbenzilidén kámfor (4MBC).....	23
3.3.3.	Etilhexil-metoxicinnamát (EHMC).....	25
3.3.4.	Oktokrilén (OC).....	31
3.4.	Bioripoter tesztrendszerek.....	33
3.4.1.	Fluoreszcenciáért felelős riporter gén .....	33
3.4.2.	Színreakcióért felelős riporter gén.....	33
3.4.3.	Biolumineszcenciáért felelős riporter gének.....	34
3.4.4.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> BLYAS.....	35
3.4.5.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> BLYES .....	36
3.4.6.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> BLYR .....	36
3.5.	Vízi ökotoxikológiai tesztorganizmusok .....	36
3.5.1.	<i>Aliivibrio fischeri</i> .....	36
3.5.2.	Zebradánió ( <i>Danio rerio</i> ) .....	37
4.	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	39
4.1.	Az UV-szűrő vegyületek biológiai hatásmérése .....	39
4.1.1.	Hormonhatás és sejtoxikus hatás vizsgálata bioripoter rendszerekkel .....	39
4.1.2.	Toxikus hatás vizsgálata vízi tesztorganizmusokon .....	41
4.2.	Biodegradációs kísérletek 5 $\alpha$ -dihidrotesztozteronnal .....	45
4.2.1.	Biodegradáció élő sejtekkel.....	45
4.2.2.	Biodegradáció extracelluláris kivonattal .....	46
4.2.3.	A biodegradációs hatékonyság vizsgálata .....	47
5.	EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK .....	49
5.1.	Az UV-szűrő vegyületek biológiai hatásmérése .....	49
5.1.1.	Hormonhatás és sejtoxikus hatás vizsgálata bioripoter rendszerekkel .....	49

5.1.2.	Toxikus hatás vizsgálata vízi testszervezeteken .....	60
5.2.	Biodegradációs kísérletek 5 $\alpha$ -dihidrotesztoszteronnal .....	70
5.2.1.	Biodegradáció élő sejtekkel .....	70
5.2.2.	Biodegradáció extracelluláris kivonattal .....	73
5.2.3.	Új tudományos eredmények (az 5.2 fejezet alapján) .....	75
6.	KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK .....	76
7.	ÖSSZEFOGLALÁS .....	81
8.	ENGLISH SUMMARY .....	83
9.	MELLÉKLETEK .....	85
9.1.	Melléklet: Felhasznált irodalom .....	85
9.2.	Melléklet: Alkalmazott tápoldatok .....	105
9.3.	Melléklet: A <i>Saccharomyces cerevisiae</i> tesztekben vizsgált hígítási sorok .....	107
9.4.	Melléklet: SDS-PAGE .....	108
9.5.	Melléklet: .....	108
10.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS .....	109

## 1. JELÖLÉSEK, RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

3 $\alpha$ -HSD – 3 $\alpha$ -hidroxiszteroid-dehidrogenáz enzim

4DHB – 4'4-dihidroxibenzofenon

4HB – 4-hidroxibenzofenon

4HT – 4-hidroxitamoxifen

4MBC – 4-metilbenzilidén kámfor

AHL – acil homoszerin lakton

AhR – aril szénhidrogén receptor

ARE – Androgen Response Elements (Androgén Válasz Elemek)

BLYAS – Bioluminescent Yeast Androgen Screen (Androgén hatást mérő biolumineszcens élesztő törzs)

BLYES – Bioluminescent Yeast Estrogen Screen (Ösztrogén hatást mérő biolumineszcens élesztő törzs)

BLYR – Bioluminescent Yeast Reporter (Biolumineszcens élesztő bioripporter)

BP – benzofenon

BP-1 – benzofenon-1

BP-2 – benzofenon-2

BP-3 – benzofenon-3

BS – benzil-szalicilát

CLP – Classification, labelling and packaging of substances and mixtures (Az anyagok és keverékek osztályozása, címkézése és csomagolása)

Cps – counts per second (másodpercenkénti számérték)

DDT – diklór-difenil-triklóretán

DHT – 5 $\alpha$ -dihidrotesztoszteron

DMSO – dimetil-szulfoxid

DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Német Mikroorganizmus és Sejtkultúra Gyűjtemény)

Dw – dry weight (száraz tömeg)

E2 – 17 $\beta$ -ösztradiol

EC – effective concentration (hatásos koncentráció)

ECHA – European Chemicals Agency (Európai Vegyianyag-ügynökség)

ED – Endocrine Disruptor (hormonháztartást megzavaró)

EDCs – Endocrine Disrupting Chemicals (hormonháztartást megzavaró vegyületek)

EHMC – etilhexil-metoxicinnamát

ER $\alpha$  –  $\alpha$ -típusú ösztrogén receptor

ER $\beta$  –  $\beta$ -típusú ösztrogén receptor

ERE – Estrogen Response Elements (Ösztrogén Válasz Elemek)

FMNH<sub>2</sub> – redukált riboflavin foszfát

FSH – folliculusstimuláló (tüszőérlelő) hormon

FT – flutamid

GC-MS – gázkromatográfia-tömegspektrometria

GFP – Green Fluorescent Protein (zölden fluoreszkáló protein)

hAR – humán androgén receptor

hER $\alpha$  –  $\alpha$ -típusú humán ösztrogén receptor

Hpf – hours post fertilization (adott órával a megtermékenyülést követően)

hPR – humán progeszteron receptor

*hsd17b3* – 17 $\beta$ -hidroxiszteroid-dehidrogenáz 3 enzimet kódoló gén

IC – inhibitory concentration (gátlási koncentráció)

*kshA* – 3-ketoszteroid-9 $\alpha$ -hidroxiláz enzimet kódoló gén *A* alegysége

KstD3 – 3-ketoszteroid- $\Delta^1$ -dehidrogenáz 3 enzim

LC – lethal concentration (halálos koncentráció)

LH – luteinizáló hormon

NOEC – No-Observed-Effect Concentration (A legmagasabb, megfigyelhető hatást még nem okozó koncentráció)

OC – oktokrilén

OD<sub>600</sub> – Optical Density 600 (600 nm hullámhosszúságú fény abszorbanciája alapján mért optikai denzitás)

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

PAH – policiklusos aromás szénhidrogén

PCB – poliklórozott bifenil

PCOS – Polycystic Ovary Syndrome (Policisztás Ovárium Szindróma)

REACH – Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (A vegyi anyagok regisztrálása, értékelése, engedélyezése és korlátozása)

rtER – rainbow trout estrogen receptor (szivárványos pisztrángból származó ösztrogén receptor)

SDS – nátrium-dodecil-szulfát

SDS-PAGE – sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (Nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézis)

2,3,7,8-TCDD – 2,3,7,8-tetraklórdibenzo-*p*-dioxin

Ttkg – testtömeg kilogramm

USEPA – United States Environmental Protection Agency (Amerikai Környezetvédelmi Hivatal)

UV – ultraviolet (ultraibolya)

## 2. BEVEZETÉS

*„Egyedül az igazság győzhet,  
s azt csak kutatás útján lehet megtalálni;”  
Irinyi János*

A természetes és főként a szintetikus vegyületek használata mindennapjaink része, azonban mostanra világossá vált, hogy e több millió vegyület közül kb. 800 ismertén vagy feltételezetten hormonháztartást megzavaró (ED – endocrine disruptor) hatású (Bergman et al., 2012). A felhasznált vegyületek, illetve az emberi szervezetből távozó hormonhatású szteroidok legtöbbször a szennyvízcsatornába kerülnek. A szennyvíztisztítókból származó tisztított vizekből – melyeket szinte mindig felszíni vizekbe vezetnek be – számos esetben mutattak ki hormonháztartást megzavaró vegyületeket (EDCs – endocrine disrupting chemicals). A környezetünkben lévő, több ezer vegyület ED hatását először gyors és költséghatékony módszerekkel érdemes felderíteni, melyek egyszerre nagy mennyiségű vegyület vizsgálatát teszik lehetővé. A célra alkalmasak lehetnek a prokarióta és egysejtű eukarióta biorporter tesztrendszerek, melyek élő szenzorként jelzik a vegyületek bizonyos káros biológiai hatásait. Szükséges továbbá az ökoszisztémára gyakorolt káros hatások felderítése is, melyre szabványosított ökotoxikológiai tesztek jelenthetnek megoldást.

Szennyvizek, illetve felszíni vizek analitikai vizsgálata során a szteroid ösztrogének mellett egyre több figyelem irányul az androgén vegyületekre is. Környezeti mátrixokban általában a tesztoszteron, az 5 $\alpha$ -dihidrotesztoszteron (DHT), az androszteron és az androszténdion fordul elő a legnagyobb koncentrációban a természetes androgén szteroidok közül. A szteroid ösztrogének és androgének élettani szerepéről már részletes ismeretekkel rendelkezünk, viszont környezeti elemekből történő eltávolításuk megoldásra váró feladat, melyben a különböző fizikai és oxidációs módszerek mellett fontos szerepe van a biodegradáción alapuló technikáknak is.

Az emberek által felhasznált vegyületek közül a testápolási szerek alkotói is széleskörben előfordulnak felszíni vizekben. Ilyen vegyületek a fertőtlenítő- és tartósítószer, az illatanyagok, a rovarriasztók és az UV-sugárzást elnyelő, azaz UV-szűrő vegyületek. A XXI. században a szépségipar figyelme egyre inkább az UV-szűrő vegyületek felé fordult, mivel az UV-sugárzás bőröregítő, bőrkárosító hatása mostanra közismertté vált. Az ózonréteg elvékonyodásával egyre több UV-sugárzás éri el a földfelszínt, így fontosnak tartották, hogy



minél több kozmetikai készítmény tartalmazzon UV-szűrő vegyületet. Annak ellenére, hogy nagy mennyiségben kerülnek felhasználásra, kevés ismerettel rendelkezünk a toxicitásukról, illetve a vízi élőlényekre gyakorolt kockázatukról. Előfordulhatnak vízi élőlények zsírszövetében, illetve anyatejben is. Mindemellett agonista és antagonistá ED hatással is rendelkezhetnek, ráadásul a legtöbb vegyület több, különböző hatással is jellemezhető. Tehát az agonista hormonhatás mellett fontos az antagonistá hatás vizsgálata is. A szakirodalomban azonban még kevés és olykor egymásnak ellentmondó eredmények találhatók az UV-szűrő vegyületek ED hatásával kapcsolatban, ráadásul *in vivo* hormonhatás vizsgálati eredmény csak elenyésző mennyiségben áll rendelkezésre. A hormonrendszer működését megzavaró hatásokon túl egyre több cikk számol be a vízi élőlényekre gyakorolt olyan káros hatásokról, mint pl. oxidatív stressz, növekedés gátlás, letalitás. Mindezek alapján fontos, hogy különböző hagyományos és magasszintű ökotoxikológiai tesztek segítségével feltárjuk az UV-szűrők ED hatását és toxicitását, valamint kidolgozzunk olyan módszereket, melyekkel megvalósítható a vegyületek biodegradációja.

Doktori munkám során célom volt a természetes EDC-k közül a legmagasabb androgén aktivitással rendelkező DHT, míg a mesterséges eredetű EDC-k közül a felszíni vizekben legsűrűbben kimutatható és kozmetikai termékekben leggyakrabban alkalmazott UV-szűrők közül a benzofenon-3 (BP-3), a 4-metilbenzilidén kámfor (4-MBC), az etilhexil-metoxicinnamát (EHMC) és az oktokrilén (OC) vizsgálata.

Az UV-szűrők esetében a következő célokat tűztem ki munkám során:

- A kiválasztott UV-szűrők ösztrogén, androgén, antiösztrógen és antiandrogén, illetve sejttóxicus hatásának meghatározása biolumineszcens bioriporterekkel.
- A BP-3 toxicitásának prokarióta és eukarióta vízi tesztszervezeteken (*Aliivibrio fischeri* és *Danio rerio*) való vizsgálata.

A DHT esetében célom volt:

- Megvalósítani a vegyület mikrobiális biodetoxifikációját.
- Sikeres biodegradáció esetén feltárni, hogy a bontást indukált vagy konstitutív enzimek végzik-e.

### 3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

#### 3.1. A hormonrendszer és a hormonháztartást megzavaró vegyületek

A szervezetben a hormonok termelésében a hipotalamusz, a hipofízis, a pajzsmirigy, a mellékpajzsmirigy, a hasnyálmirigy, a mellékvese, a petefészek, a here, a máj, a vese, a méhlepény és a bélrendszer játszik szerepet. A hormonok a vérárammal a szervezet távolabbi célszervéhez vagy szövetéhez jutva, ng/mL vagy pg/mL koncentrációban fejtik ki hatásukat. A hormonoknak szerepük van a növekedés, a metabolizmus, a reprodukció és más belső elválasztású mirigyek szabályozásában (USEPA 1997). A szervezetben a hormonok receptorokhoz kötődve fejtik ki hatásukat. A receptorok elhelyezkedhetnek a sejtmembránon/sejtfalon, a citoplazmában, illetve a sejtmagban. A receptorok funkciója a kémiai jelfelismerés mellett az aktív információtovábbítás. Azt a ligandot (kötődő molekulát), mely receptormediált aktív sejtválasz kezdeményezésére képes, agonistának nevezzük. Teljes (full) agonista az a ligand, mely alacsony receptorfrakció elfoglalásakor is képes maximális biológiai választ előidézni; míg részleges (parciális) agonista az a ligand, mely teljes receptor okkupancia (a rendelkezésre álló receptorok hatóanyag-telítettsége) mellett is csak a lehetséges maximális biológiai válasz töredékét képes produkálni. Antagonista az a ligand, mely kötődik a receptorhoz, de azon aktív biológiai választ nem kezdeményez (Rónai 2004).

Az EDC-k olyan exogén vegyületek, amelyek megzavarják a homeosztázis fenntartásáért, a reprodukcióért, fejlődésért és/vagy viselkedésért felelős természetes hormonok szintézisét, szekrécióját, transzportját, kötődését, működését vagy eliminációját (USEPA 1997). ED hatással természetes eredetű és mesterségesen előállított vegyületek is rendelkezhetnek. Az EDC-knek való kitettség súlyos következményekkel járhat, melyekről pl. Diamanti-Kandarakis és mtsai (2009) készítettek összefoglaló tanulmányt. Többek között olyan betegségek kialakulásában játszhatnak szerepet, mint a policisztás ovárium szindróma (PCOS) (Takeuchi et al., 2004), jóindulatú méhizomdaganat (uterine leiomyoma) (Newbold et al., 2002), endometriózis (Cobellis et al., 2003), mellrák (Palmer et al., 2006), jóindulatú prosztata megnagyobbodás és prosztata rák (Ho et al., 2006; Leav et al., 1988; Modugno et al., 2001; Prince et al., 2006; Prins et al., 2008; Thomas & Keenan 1994). Ezenkívül befolyásolhatják a spermaszámot és azok mozgékonyágát (Meeker et al., 2004; Mocarelli et al., 2008). Hatással lehetnek a neuroendokrin rendszerre (Rasier et al., 2008) és a viselkedésre is (Chung et al., 2001; Whitten et al., 1995). Az EDC-k a pajzsmirigy működését is befolyásolhatják (Kitamura et al., 2002; Moriyama et al., 2002), továbbá összefüggésbe hozhatók az elhízással és cukorbetegséggel is (Dang et al., 2003; Newbold et al., 2007).

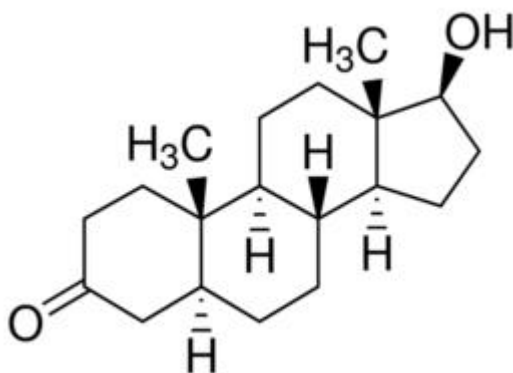
Az EDC-k azonosítása, az általuk jelentett kockázat felmérése bonyolult feladat. Kihívást jelent, hogy az ED hatás nemcsak dóziszfüggő, hanem az adott élőlény fejlődési stádiumától is függ. Ráadásul a korai fejlődési szakasz folyamán bekövetkező expozíció hatása nem feltétlenül jelentkezik azonnal, hanem gyakran csak később, felnőtt korban nyilvánul meg. A kutatások többsége egy vegyület által okozott hatásokra összpontosít, azonban a valóságban egyszerre több olyan vegyület hatásának is ki vagyunk téve, melyek ED hatásúak lehetnek. Mindemellett, feltételezhetően számos vegyület többes-hormonhatással is jellemezhető (Kunz & Fent 2006). Pl. a biszfenol-A esetében ösztrogén, antiösztrogén és antiandrogén (Lee et al., 2003) hatást is kimutattak. A peszticidek közül a diklór-difenil-diklóretilén (*p,p'*-DDE) (Gaido et al., 1997; Kelce et al., 1995) és metoxiklór, illetve metabolitjai (Gaido et al., 2000) mind ösztrogén, mind antiandrogén hatással rendelkeznek. Az EDC-k szerkezetüket tekintve igen sokfélék, vannak köztük a biológiai lebontásnak ellenálló és a környezetben hosszú időn keresztül jelen lévő vegyületek, de előfordulnak olyanok is, melyek könnyen bomlanak, viszont a környezetbe való folyamatos kijutás révén szintén állandó kitettséget jelentenek az élőlények és az emberek számára (Bergman et al., 2012).

### **3.2. Természetes eredetű hormonháztartást megzavaró vegyületek**

A természetes eredetű EDC-k közé tartoznak a természetes hormonok (pl. női és férfi nemi hormonok) és metabolitjaik, a nem-szteroid fitoösztrogének (pl. kumesztánok, stilbének, izoflavonok, lignánok), melyek széleskörűen megtalálhatóak növényekben, továbbá bizonyos penészgombák másodlagos anyagcseréje során keletkező mikoösztrogének (pl. zearalenon) (Burkhardt-Holm 2010; Sirotkin & Harrath 2014; Steyn 1995). Doktori kutatásom során a természetes hormonok közül az androgénhormonokhoz tartozó DHT vizsgálatával foglalkoztam, melynek főbb tulajdonságait az alábbi alfejezetben ismertetem.

#### **3.2.1. 5 $\alpha$ -dihidrotesztoszteron (DHT)**

Az 1967-ben felfedezett DHT (1. ábra) a tesztoszteron androszteronná alakulása során egy közti lépésben keletkezik 5 $\alpha$ -reduktáz enzim hatására (Bruchovsky & Wilson 1999). A DHT a leghatékonyabb endogén androgén hormon, melynek jelentősen nagyobb az affinitása az androgén receptorhoz, mint a tesztoszteronnak (Grino et al., 1990).



1. ábra: Az 5 $\alpha$ -dihidrotesztoszteron szerkezeti képlete (forrás: <http1>)

A természetes hormonok fő forrása a kommunális szennyvizekben az emberi vizelet. Egy felnőtt férfiből átlagosan 14,1  $\mu\text{g}/\text{nap}$  DHT távozik a vizelettel (Liu et al., 2009). Liu és mtsai (2011) 2 kínai szennyvíztisztítóból és a Danshui-folyóból származó minták szteroid tartalmát vizsgálták. Mindkét szennyvíztisztító befolyó vizében az androgének közül a DHT fordult elő a legnagyobb koncentrációban (621 ng/L és 326 ng/L). Az egyik szennyvíztisztító kifolyó vizében a DHT 77,3 ng/L koncentrációt ért el, míg a másik szennyvíztisztító kifolyó vizében nem volt kimutatható. A DHT a víztelenített szennyvíziszapban 94 ng/g koncentrációban volt jelen. A Danshui-folyóban a DHT koncentrációja 38,6 ng/L és 55,3 ng/L között változott a felső, illetve alsó szakasz között. E felszíni vízben szintén a DHT érte el a legmagasabb koncentrációt az androgének közül. Bellet és mtsai (2012) Franciaországban 6 szennyvíztisztító befolyó vizét vizsgálták. A legnagyobb koncentrációban a tesztoszteron, a DHT és az epiandroszteron (5 $\alpha$ -androsztán-3 $\beta$ -ol-17-on) fordult elő.

A DHT a környezetbe kikerülve változásokat idézhet elő a mikrobák életfolyamataiban. A baktériumok rendelkeznek olyan receptorokkal, melyekhez emlősből származó hormonok képesek kapcsolódni és választ indukálni (Lenard 1992; Rowland et al., 1992). A DHT 0,5; 1 és 5  $\mu\text{M}$  (0,15; 0,29 és 1,5 mg/L) koncentrációban felgyorsította az *Escherichia coli* szaporodását, míg a *Pseudomonas aeruginosa* esetében lelassította 5  $\mu\text{M}$  koncentrációban (Plotkin et al., 2003). A szaporodás mellett a DHT befolyásolja a baktériumok antibiotikum érzékenységét is. A *P. aeruginosa* érzékenysége 1  $\mu\text{M}$  DHT hatására növekedett a *tobramycin*-nel szemben, míg a *cefepime* antibiotikummal szemben csökkent az érzékenysége (Plotkin et al., 2003).

A DHT halakban befolyásolhatja a vitellogenin és növekedési faktorok szintézisét. Nőstény tilápia (*Oreochromis mossambicus*) májsejtjeinek vitellogenin szintézise növekedett 100  $\mu\text{M}$  DHT (29 mg/L) hatására. Az inzulinszerű növekedési faktor-I szintézisét a nőstény

tilápiában gátolta (100  $\mu\text{M}$  DHT), míg a hím tilápiában serkentette (0,1  $\mu\text{M}$  DHT) (Riley et al., 2004). Szivárványos pisztráng (*Oncorhynchus mykiss*) esetében mind a hímek (5 mg/ttkg/nap DHT), mind a nőtények (50 mg/ttkg/nap DHT) vitellogenin szintjét, illetve a májban lévő P450 enzim össz mennyiségét (0,05 mg/ttkg/nap DHT) csökkentette (Shilling & Williams 2000).

A DHT (0,7 nM= 2E-04 mg/L) szignifikánsan gátolta a luteinizáló hormon (LH) szekrécióját és csökkentette a progeszteron hatását patkány hipofízis sejtekkel végzett kísérletben (Turgeon & Waring 1999). Egér T-limfociták esetében 0,1  $\mu\text{M}$  DHT csökkentette a gamma-interferon, interleukin-4 és interleukin-5 termelést. Hasonló eredményt kaptak a kísérlet *in vivo* elvégzésével (Araneo et al., 1991). Patkányokkal végzett kísérletekben bebizonyosodott, hogy a DHT befolyásolja a nőtény patkányok nemi érését (McDonald & Doughty 1972). 2,5 mg DHT/pellet (bőr alá beültetve) petefészket eltávolított patkányoknál testtömeg gyarapodást, a csontok ásványi anyag tartalmának növekedését, a csontok teljes kalcium tartalmának növekedését és csontnövekedést okozott (Coxam et al., 1996).

Az előző bekezdésben bemutatott hatástani vizsgálatokban a DHT koncentrációja meghaladta a környezetben eddig kimutatott legmagasabb koncentrációt (77,3 ng/L, azaz 0,27 nM) (Liu et al., 2011), azonban a DHT környezeti koncentrációjáról még kevés adattal rendelkezünk. Turgeon és Waring (1999) vizsgálatában 200 ng/L DHT – mely csupán 2,5-szerese a jelenleg környezetileg releváns koncentrációnak – szignifikánsan befolyásolta patkányok hormonrendszerét, így a felszíni vizek androgén hatását csökkentő módszer kidolgozására van szükség.

A DHT biodegradációjának kapcsán elmondható, hogy számos baktériumból sikerült izolálni és azonosítani olyan enzimeket, melyek szteroidok, illetve a DHT bontásában vesznek részt az alábbiak szerint:

- 3 $\alpha$ -hidroxiszteroid-dehidrogenáz (3 $\alpha$ -HSD)

A *Comamonas testosteroni* baktériumból izolált 3 $\alpha$ -HSD az androgének metabolizmusának egyik kulcsenzime, mivel számos szteroid, mint pl. androsztándion, DHT, androszteron oxidoredukciójában vesz részt (Kisiela et al., 2012). A DHT-ből 3 $\alpha$ -HSD segítségével androsztán-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol keletkezik (<http2>). A *C. testosteroni*-ből izolált 3 $\alpha$ -HSD enzimmel homológ enzimeket több baktériumban is kimutattak. Főként az *Actinobacteria* törzsbe, illetve kisebb mértékben a *Proteobacteria* törzsbe tartozó baktériumoknál találtak homológ enzimeket (pl. *Rhodococcus opacus* B4, *R. jostii* RHA1, *Cupriavidus taiwanensis*) (Kisiela et al., 2012).

- 3-ketoszteroid- $\Delta^1$ -dehidrogenáz 3 (KstD3)

A KstD3 enzim a legnagyobb aktivitást az 5 $\alpha$ -androsztán-3,17-dion, illetve DHT vegyületeken mutatja (Knol et al., 2008). A KstD3 enzim génjei olyan konzervatív génszakaszok között helyezkednek el, melyeken szintén a szteroid katabolizmusban szerepet játszó gének találhatóak (De las Heras et al., 2012). A KstD enzimek széles körben megtalálhatóak az *Actinobacteria* törzsbe tartozó mikrobákban, különösképpen *Rhodococcus* fajokban (Knol et al., 2008; Mathieu et al., 2010; McLeod et al., 2006; Molnár et al., 1995; Morii et al., 1998; Wovcha et al., 1979). A KstD enzimmel homológ enzimet a *Proteobacteria* törzshöz tartozó baktériumoknál (pl. *Cupriavidus taiwanensis*) is találtak (Kisiela et al., 2012).

- 3-ketoszteroid-9 $\alpha$ -hidroxiláz A 5 (KshA5)

A *Rhodococcus rhodochrous* DSM43269-es törzsben 5 különböző 3-ketoszteroid-9 $\alpha$ -hidroxiláz A (*kshA*) homológot (*kshA1-kshA5*) azonosítottak (Petrusma et al., 2009; Wilbrink et al., 2011). E gének által kódolt enzimek számos 3-ketoszteroidon mutatnak aktivitást (Petrusma et al., 2011), ahol a szteránváz 9-es szénatomján  $\alpha$  helyzetű hidroxil-csoportot alakítanak ki (van der Geize et al., 2002). A KshA5 enzim rendelkezik a legszélesebb szubsztrátkörrel, viszont nincs olyan szubsztrát, melyet különösebben előnyben részesítene. A KshA enzimek között egyedülálló módon képes a DHT és a 11 $\beta$ -hidrokortizon átalakítására (Petrusma et al., 2011).

Ezen információk alapján a *Rhodococcus* és *Cupriavidus* nemzetségekbe tartozó törzsek alkalmasak lehetnek szteroidok, így a DHT biodegradációjára is. Mindemellett a *Rhodococcus* nemzetségbe tartozó baktérium törzsek előnyös fiziológiai tulajdonságokkal is jellemezhetőek, mint például a különféle szubsztrátokkal, illetve oldószerekkel szembeni tolerancia (Larkin et al., 2005), továbbá nem vetnek fel humán-egészségügyi aggályokat.

### 3.3. Mesterséges eredetű hormonháztartást megzavaró vegyületek

A mesterséges eredetű EDC-k közé sorolhatók a szintetikus hormonok (pl. dietilstilbösztrol, 17 $\alpha$ -etinilösztadiol), hormonális mellékhatással rendelkező gyógyszerek (pl. klofibrát), ipari és háztartási vegyi anyagok [pl. poliklórozott bifenilek (PCB-k), égésgátlók, festékek, lágyítók (biszfenol-A, ftalátok), alkilfenol-etoxilát detergenssek, UV-szűrő vegyületek], peszticidek és metabolitjaik [pl. diklór-difenil-triklóretán (DDT), *atrazine*], illetve ipari és háztartási folyamatok melléktermékei [pl. policiklusos aromás szénhidrogének (PAH-ok), 2,3,7,8-tetraklórdibenzo-*p*-dioxin (2,3,7,8-TCDD)] (Burkhardt-Holm 2010). Dolgozatomban a mesterséges eredetű EDC-k közül az UV-szűrő vegyületek vizsgálatával foglalkoztam.

Az emberiség az UV-sugárzás bőrkárosító hatása ellen a 19. század végétől vegyi anyagok használatával kezdett el védekezni. Az első ilyen UV-sugárzást elnyelő, azaz UV-szűrő vegyület a kinin volt. A 20. században gyors ütemben fedezték fel az UV-sugárzás elnyelésére alkalmas vegyületeket, és hozták őket kereskedelmi forgalomba, mint pl. 1935-ben a benzil-szalicilátot (BS), a 40-es években a *para*-amino-benzoészav származékokat, az 50-es években a cinnamátokat, míg a 60-as években a benzofenon (BP)-típusú vegyületeket (Urbach 2001).

A szerves UV-szűrők az UV-A (320-400 nm) és/vagy az UV-B (280-320 nm) tartományban képesek abszorbeálni a fényt. A naptejeken kívül számos más szépségipari termékben megtalálhatóak, mint pl. samponokban, testápolókban, parfümökben, ajakrúzsokban, szappanokban stb. (Hauri et al., 2003). Ezenkívül élelmiszer-csomagolóanyagokban, műanyag termékekben és textilekben is alkalmazzák e vegyületeket annak érdekében, hogy megakadályozzák a polimerek degradációját és a becsomagolt élelmiszerek minőségromlását (Valle-Sistac et al., 2016).

A bőrfelszínen alkalmazott UV-szűrő vegyületek fürdőzés, illetve úszás közben lemosódhatnak a felszíni vizekbe és úszómedencék vizébe. Ezenkívül rákerülve törölközőre, ruhára a mosás során az elfolyó mosóvízzel a szennyvízhálózatba jutnak. A bőrön át felszívódott vegyületek a kiválasztás során szintén a szennyvízbe távoznak. Ezenkívül a gyártási folyamatok során bekerülhetnek az ipari szennyvízbe, illetve a felhasznált csomagolásban maradt vegyületek hulladékként a talajba, onnan pedig talajvízbe, felszíni vízbe juthatnak (Giokas et al., 2007). Az UV-szűrők eltávolítása nem teljes a szennyvíztisztítás során, mivel – ha alacsonyabb koncentrációban is mint a befolyó szennyvízben, de – a kifolyó szennyvízben is kimutathatóak, így bekerülhetnek felszíni vizekbe (Ramos et al., 2016). A szennyvíztisztítók, illetve felszíni vizek UV-szűrők általi terhelése évszakosan változik, főként a nyári, meleg hónapokban növekszik meg a koncentrációjuk (Cunha et al., 2015). Poiger és mtsai (2004) számításai szerint a svájci Zürichi-tóba akár 966 kg UV-szűrő vegyület is kerülhet a nyári hónapok során. A legtöbb UV-szűrő lipofil és viszonylag magas oktanol-víz megoszlási hányadossal ( $\log K_{ow}$ ) rendelkezik, így potenciálisan bioakkumulatívak, felhalmozódhatnak az üledékben, illetve feltehetőleg lassan biodegradálódnak, így kockázatot jelenthetnek a vízi élővilágra (Kim & Choi 2014).

Az 1223/2009/EK rendelet tartalmazza a kozmetikai termékekben engedélyezett UV-szűrők listáját. E rendelet és módosító rendeletei (EU 2014/866; EU 2015/1298; EU 2016/621; EU 2016/1143) alapján 25 szerves, illetve 2 szervetlen ( $TiO_2$  és  $ZnO$ ) UV-szűrő vegyület engedélyezett kozmetikai termékekben való felhasználásra az Európai Unióban. Készítményekben a szerves UV-szűrők maximális koncentrációja 1-15% között lehet, míg a szervetlen UV-szűrők (mind nano és nem-nano formában) megengedett maximális

koncentrációja 25%. Sobek és mtsai (2013) azonban rávilágítottak néhány, az UV-szűrők szabályozásában előforduló ellentmondásra. Az 1223/2009/EK rendeletben az engedélyezett UV-szűrők listájának kialakítása és a kozmetikai termékekben megengedhető maximális koncentrációjuk meghatározása humán kockázatbecslésen alapult. Az 1223/2009/EK rendelet alapján e vegyületek környezeti kockázatait az 1907/2006/EK rendelet [REACH – Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (A vegyi anyagok regisztrálása, értékelése, engedélyezése és korlátozása)] alapján kell meghatározni. Az 1272/2008/EK rendelet [CLP – Classification, labelling and packaging of substances and mixtures (Az anyagok és keverékek osztályozása, címkézése és csomagolása)] alapján minden, az Európai Unióban forgalomba kerülő vegyület vagy keverék esetében meg kell határozni a felmerülő fizikai, egészségi, illetve környezeti kockázatokat és ezek alapján szükséges az előírt címkézést alkalmazni az adott vegyületet vagy keveréket tartalmazó termék csomagolásán. Az 1272/2008/EK rendelet azonban nem vonatkozik kozmetikai termékekre (ECHA 2015), tehát amennyiben egy kockázatot jelentő UV-szűrő kozmetikai termékekben fordul elő, nem kell a terméken a kockázatokra figyelmeztető címkét elhelyezni. Ellenben ha ugyanez az UV-szűrő ipari termékekben, mint például háztartási festékekben fordul elő, akkor annak csomagolásán már szükséges a kockázatokra figyelmeztető címkézést alkalmazni.

Sobek és mtsai (2013) kockázatbecslést készítettek 26 szerves UV-szűrő vegyületre az 1272/2008/EK rendeletben megadott eljárás alapján. Számításaik szerint a 26 vegyületből 12 kockázatot jelent a vízi környezetre. E 12 vegyületből 4 (BP-3, EHMC, izoamil-*p*-metoxicinnamát és 4MBC) az „aquatic acute 1” (a vízi életre nagyon toxikus) kategóriába sorolható. További 12 vegyület esetében nem állt rendelkezésre elég információ a szakirodalomban a kockázatbecslés elvégzéséhez, illetve a gyártók részéről sem történt meg e vegyületek osztályozása.

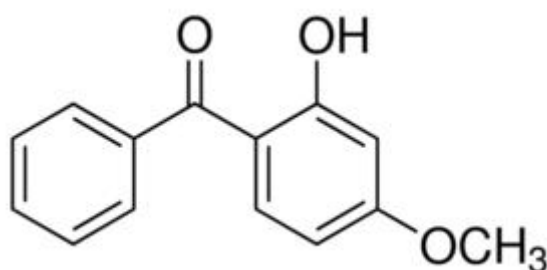
A következő alfejezetekben az általam vizsgált UV-szűrőkkel kapcsolatos szakirodalmi adatokat foglalom össze. Ezen UV-szűrők gyakran megtalálhatóak kozmetikai vagy ipari termékekben, így előfordulásuk is gyakori a különböző környezeti mátrixokban.

### **3.3.1. Benzofenon-3 (BP-3)**

Az Európai Bizottság (European Commission) CosIng adatbázisában összesen 19 benzofenon típusú vegyület található (http3). Ezek közül több feltételezetten ED hatású, illetve kockázatot jelenthet a vízi környezetre (Kunz & Fent 2006; Li 2012). Ezenkívül a benzofenon alapvegyület a WHO (World Health Organization – Egészségügyi Világszervezet) IARC (International Agency for Research on Cancer) adatbázisa alapján lehetséges humán karcinogén (2B csoport) (http4). A hidroxibenzofenon származékokat kozmetikumokon kívül UV



stabilizátorként is használják műanyag felületek bevonatában (például élelmiszer csomagolóanyagban) annak érdekében, hogy megakadályozzák a polimerek degradációját. A hidroxibenzofenon származékok növényi eredetű vegyületek, megtalálhatóak például mangóban és muskotályos szőlőben is, így élelmiszeradalékként is felhasználásra kerülnek (Suzuki et al., 2005). A hidroxibenzofenon származékok közül dolgozatomban a BP-3-mal (2. ábra) foglalkoztam. A vegyület megnevezésére összesen 8 szinonima használható. Ezek közül – a benzofenon-3 néven kívül – a leggyakoribb az oxibenzon és a 2-hidroxi-4-metoxibenzofenon (http5). A BP-3 mind az UVB mind az UVA tartományban képes fényt elnyelni (Gonzalez et al., 2006). A vegyületből csak az Európai Unióban évente 100 és 1000 tonna közötti mennyiség kerül gyártásra, illetve forgalmazásra (http6).



2. ábra: A benzofenon-3 szerkezeti képlete (forrás: http7)

Ramos és mtsai (2016) összegyűjtötték az UV-szűrők szennyvíz-tisztítóbeli előfordulásával kapcsolatos publikációkat, melyek 2000 és 2015 között jelentek meg. Ezen összefoglaló alapján a BP-származékok vannak jelen a legmagasabb koncentrációban mind a befolyó, mind a kifolyó tisztított szennyvizekben. Befolyó szennyvízben 10400 ng/L BP-3 koncentrációt mutattak ki Dél-Kaliforniában (Loraine & Pettigrove 2006). Egy svájci szennyvíztisztító kifolyó vizében 700 ng/L BP-3 koncentrációt mértek (Balmer et al., 2005). A BP-származékok közül a BP-3 esetében tapasztalták eddig a legmagasabb koncentrációt szennyvíziszapban [2116 ng/g dw (dry weight), Norvégia] (Langford et al., 2015; Ramos et al., 2016).

A szennyvíztisztítókön kívül folyókban, tavakban és talajban is kimutatható a BP-3. A svájci Glatt-folyóban 68 ng/L (Fent et al., 2010), míg a szintén svájci Hüttnersee-tóban 125 ng/L (Poiger et al., 2004) koncentrációt mértek. A spanyolországi Ebro-folyó üledékében 27 ng/g dw (Gago-Ferrero et al., 2011), illetve koreai talajmintában 2,65 ng/g (Jeon et al., 2006) koncentrációban fordult elő e vegyület.

Az édesvízen kívül tengervízben is kimutatták a BP-3 jelenlétét. A Földközi-tengerben, egy spanyolországi tengerpartnál vett mintában 3300 ng/L koncentrációban fordult elő (Tarazona

et al., 2010). Combi és mtsai (2016) az Adriai-tenger üledékében maximálisan 0,23 ng/g koncentrációban mérték ki, illetve megállapították, hogy évente 2,8 kg BP-3 halmozódik fel az üledékben.

A BP-3 élőlényekben is felhalmozódhat, a mért koncentrációk az 1. táblázatban kerültek összefoglalásra. A puhatestűek és ízeltlábúak mellett a BP-3 jelenlétét több halfajban is kimutatták már (Emnet et al., 2015; Fent et al., 2010; Gago-Ferrero et al., 2015; Langford et al., 2015). Legmagasabb koncentrációban (1037 ng/g) eddig az atlanti tőkehalban (*Gadus morhua*) fordult elő a vegyület (Langford et al., 2015). A BP-3 és metabolitjai madarak tojásában is felhalmozódhatnak. Molins-Delgado és mtsai (2017) egy spanyolországi természetvédelmi területről 39 db tojást gyűjtöttek be, melyekből nem kelt ki madár és vizsgálták e tojások UV-szűrő tartalmát. A tojások 7 különböző vadmadár fajhoz tartoztak. A vizsgálat eredménye alapján mind a 39 db tojás tartalmazott BP-3-at, benzofenon-1-et (BP-1) és 4'-dihidroxibenzofenont (4DHB), illetve 38 db tojás 4-hidroxibenzofenont (4HB). A BP-3 legmagasabb koncentrációt (49,3 ng/g dw) a kacagó csér (*Gelochelidon nilotica*) tojásában ért el (1. táblázat). A BP-3 metabolitjai magasabb koncentrációban voltak kimutathatóak a tojásokból. A BP-1 a dankasirály (*Chroicocephalus ridibundus*) tojásában 677 ng/g dw, a 4HB a fehér gólya (*Ciconia ciconia*) tojásában 3348 ng/g dw, míg a 4DHB a vörös vércse (*Falco tinnunculus*) tojásában 132 ng/g dw koncentrációt is elért.

1. táblázat: A benzofenon-3 előfordulása élőlényekben

Élőlény	Koncentráció	Hivatkozás
Tengeri kagyló ( <i>Laternula elliptica</i> )	108 ng/g dw	Emnet et al. (2015)
Tengeri sün ( <i>Sterechinus neumayeri</i> )	8,6 ng/g dw	Emnet et al. (2015)
Garnélarák ( <i>Pandalus borealis</i> )	68,9 ng/g	Langford et al. (2015)
Andalúziai márna ( <i>Luciobarbus sclateri</i> )	24,3 ng/g dw	Gago-Ferrero et al. (2015)
Ponty ( <i>Cyprinus carpio</i> )	11,2 ng/g dw	Gago-Ferrero et al. (2015)
Sebes pisztráng ( <i>Salmo trutta fario</i> )	4,6 ng/g dw; 151 ng/g lipid	Gago-Ferrero et al. (2015); Fent et al. (2010)
Atlanti tőkehal ( <i>Gadus morhua</i> )	1037 ng/g	Langford et al. (2015)
Kacagó csér ( <i>Gelochelidon nilotica</i> ) tojás	49,3 ng/g dw	Molins-Delgado et al (2017)

Az állatvilágon kívül a BP-3 emberekben is előfordulhat. Egy amerikai felmérés során 2517 db vizeletminta BP-3 tartalmát vizsgálták. A minták közel 97%-ában volt jelen e vegyület,

a mért értékek 0,4-21700 µg/L koncentrációtartományba estek. Átlagosan 22,9 µg/L BP-3 volt a vizsgált emberek vizeletében (Calafat et al., 2008). Egy másik amerikai felmérés során 625 vizeletmintában vizsgálták egyes BP-származékok jelenlétét. A BP-3 a vizsgált minták 99%-ában volt jelen, míg e vegyület metabolitja, a BP-1 93,3%-ában. A medián koncentráció mindkét vegyület esetében 6,1 µg/L volt, míg a maximális koncentráció 5900 µg/L (BP-3) és 3200 µg/L (BP-1) volt. A kutatók szignifikáns korrelációt tapasztaltak a BP-1 vizeletbeli koncentrációja és az endometriózis előfordulása között. A BP-3 esetében ez az összefüggés nem volt szignifikáns, de az endometriózis előfordulásának növekvő trendje volt megfigyelhető a BP-3 koncentráció növekedésével (Kunisue et al., 2012). A vizeleten kívül anyatejben is előfordult a BP-3. Az 54 vizsgált mintából 7 mintában volt jelen a vegyület, átlagosan 52,23 ng/g lipid koncentrációban (Schlumpf et al., 2010).

Számos *in vitro* vizsgálatban bebizonyosodott, hogy a BP-3 több, különböző ED hatással is rendelkezik, így környezetben, illetve biótában való jelenléte aggodalomra adhat okot. A BP-3 ösztrogén hatásának ( $EC_{50}= 3,73 \mu\text{M}$ ; 0,85 mg/L) bizonyult az MCF-7 mellráksejtvonalon vizsgálva (Schlumpf et al., 2001). Rekombináns élesztő (*Saccharomyces cerevisiae*) tesztben a BP-3 mind  $\alpha$ -típusú humán ösztrogén receptorhoz (hER $\alpha$ ) ( $EC_{50}= 18,6 \mu\text{M}$ ; 4,25 mg/L), mind szivárványos pisztráng ösztrogén receptorjához (rtER – rainbow trout estrogen receptor) ( $EC_{50}= 21,9 \mu\text{M}$ ; 5 mg/L) képes volt kapcsolódni (Kunz & Fent 2006; Kunz et al., 2006). A BP-3 antagonistá hatással is jellemezhető, rekombináns élesztő tesztben antiösztrogén ( $IC_{50}= 17,8 \mu\text{M}$ ; 4,1 mg/L) és antiandrogén ( $IC_{50}= 3,68 \mu\text{M}$ ; 0,84 mg/L) hatással rendelkezett (Kunz & Fent 2006). A HEK 293 humán embrionális vesesejtvonallal végzett vizsgálatban szintén antiandrogén hatásának bizonyult a BP-3 ( $IC_{50}= 3,1 \mu\text{M}$ ; 0,71 mg/L) (Nashev et al., 2010). A módosított, humán androgén receptort (hAR), illetve humán progeszteron receptort (hPR) kódoló gént tartalmazó U2-OS humán oszteoszarkóma sejtvonalon a BP-3 antiandrogén ( $IC_{50}= 2 \mu\text{M}$ ; 0,46 mg/L) és antiprogesztagén ( $IC_{50}= 5,2 \mu\text{M}$ ; 1,19 mg/L) hatást mutatott (Schreurs et al., 2005).

A BP-3 ED hatásáról *in vivo* adatok is rendelkezésre állnak, melyek a 2. táblázatban kerültek összefoglalásra. Felnőtt és embrió zebradániók esetében a BP-3 számos hormonháztartáshoz kapcsolódó gén átíródásában okozott változást, melyek alapján a vegyület antiösztrogén és antiandrogén hatására következtethetünk (Blüthgen et al., 2012). Mivel Blüthgen és mtsai (2012) laboratóriumi kísérletében 2,4 µg/L BP-3 koncentráció a felnőtt zebradánióknál transzkripciós változást eredményezett, így elképzelhető, hogy a környezetben élő halakban is bekövetkezik e változás, hiszen a BP-3 kifolyó szennyvízben 0,7 µg/L (Balmer et al., 2005), míg tengervízben 3,3 µg/L (Tarazona et al., 2010) koncentrációban fordult elő. A BP-3 ösztrogén hatására utal, hogy halakban szignifikánsan növelte a vitellogenin-szintézist

(Coronado et al., 2008). Halakon kívül patkánykísérletekben is vizsgálták a BP-3 hormonhatását. Magas dózisoknál a méhtömeg növekedését és hormonháztartáshoz kapcsolódó gének átíródásának változását tapasztalták (Schlecht et al., 2004; Schlumpf et al., 2001).

2. táblázat: A benzofenon-3 hormonháztartást megzavaró hatására irányuló *in vivo* vizsgálatok

Tesztorganizmus	Koncentráció	Kitérés időtartama	Hatás	Hivatkozás
Zebradánió ( <i>Danio rerio</i> ) felnőtt	0,37 µM (84 µg/L)	14 nap	<i>era</i> , <i>ar</i> és <i>cyp19b</i> átíródás csökkenése az agyban	Blüthgen et al. (2012)
			<i>hsd17b3</i> átíródás csökkenése a herében	
	1,37 µM (312 µg/L)		<i>cyp11a1</i> átíródás növekedése	
0,0105 µM (2,4 µg/L)	<i>cyp19a</i> átíródás növekedése a herében			
Zebradánió ( <i>Danio rerio</i> ) embrió	1,92 µM (438 µg/L)	120 óra	<i>era</i> átíródás csökkenése	
	0,5 µM (114 µg/L)		<i>hsd17b3</i> átíródás csökkenése	
Szivárványos pisztráng ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	3,28 µM (749 µg/L)	14 nap	vitellogenin- szintézis növekedése	Coronado et al. (2008)
Japán medaka ( <i>Oryzias latipes</i> )	2,72 µM (620 µg/L)	21 nap		
Long-Evans patkány	1500 mg/kg/nap	4 nap	méhtömeg növekedése	Schlumpf et al. (2001)
Sprague–Dawley patkány	250 mg/ttkg	5 nap	<i>era</i> átíródás csökkenése a hipofízisben	Schlecht et al. (2004)
			<i>erβ</i> átíródás növekedése a méhben	

Jelmagyarázat: *era*: α-típusú ösztrogén receptort kódoló gén; *ar*: androgén receptort kódoló gén; *cyp19b*: P450 aromataz B-t kódoló gén; *hsd17b3*: 17β-hidroxiszteroid-dehidrogenáz 3 enzim kódoló gén; *cyp11a1*: P450 monooxygenáz enzim kódoló gén; *cyp19a*: P450 aromataz A-t kódoló gén; *erβ*: β-típusú ösztrogén receptort kódoló gén

A BP-3 a különböző ED hatásokon túl egyéb káros hatásokat is gyakorol az élővilágra, melyekre ökotoxikológiai vizsgálatok eredményei alapján következtethetünk (3. táblázat). A BP-3 pl. gátolhatja algák növekedését (Paredes et al., 2014; Sieratowicz et al., 2011), korallak kifehéredését és alakdeformációját okozhatja (Downs et al., 2016), befolyásolhatja a stresszválaszban szerepet játszó enzimek aktivitását (Gao et al., 2013; Liu et al., 2015b), illetve csökkentheti a kelési sikert (Coronado et al., 2008; Ozáez et al., 2014).

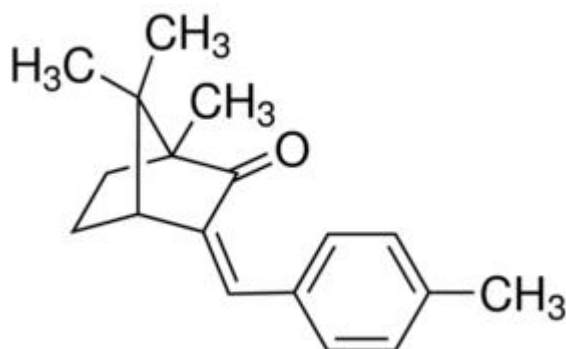
A szakirodalmi adatokat tekintve (3. táblázat) a BP-3 a *Stylophora pistillata* korall lárvák és a *Tetrahymena thermophila* esetében, környezetileg releváns koncentrációkban (2,28 µg/L; 1 µg/L) káros hatásokat okozott (Balmer et al., 2005; Downs et al., 2016; Gao et al., 2013; Tarazona et al., 2010).

3. táblázat: A benzofenon-3 káros hatásai különböző ökotoxikológiai tesztszervezeten

Tesztszervezet	Koncentráció	Kitettség időtartama	Hatás	Hivatkozás
<i>Photobacterium phosphoreum</i> (tengeri baktérium)	IC <sub>50</sub> = 62,5 μM (14,27 mg/L)	15 perc	fénykibocsátás gátlás	Liu et al. (2015a)
<i>Isochrysis galbana</i> (alga)	IC <sub>50</sub> = 61,3 nM (14 μg/L)	72 óra	növekedési ráta csökkenés	Paredes et al. (2014)
<i>Desmodesmus subspicatus</i> (alga)	IC <sub>50</sub> = 4,2 μM (960 μg/L)			Sieratowicz et al. (2011)
<i>Stylophora pistillata</i> (korall faj) lárva	10 nM (2,28 μg/L)	8 óra	alak deformáció, kifehéredés	Downs et al. (2016)
	1,26 μM (288 μg/L)		sejt degradáció, szöveti lízis	
<i>Tetrahymena thermophila</i> (csillós egysejtű)	21,9 μM (5 mg/L)	6 óra	csökkent életképesség	Gao et al. (2013)
	IC <sub>50</sub> = 32,9 μM (7,5 mg/L)	24 óra	szaporodás gátlás	
	4,4 nM (1 μg/L)		kataláz enzim aktivitás növekedése és a glutation tartalom csökkenése	
<i>Paracentrotus lividus</i> (tengeri sünn) lárva	IC <sub>50</sub> = 14,4 μM (3,28 mg/L)	48 óra	növekedés gátlás	Paredes et al. (2014)
<i>Daphnia magna</i> (nagy bolharák)	IC <sub>50</sub> = 7,3 μM (1,67 mg/L)	48 óra	immobilizáció	Sieratowicz et al. (2011)
<i>Siriella armata</i> (rákfaj) lárva	IC <sub>50</sub> = 3,1 μM (711 μg/L)	96 óra	pusztulás	Paredes et al. (2014)
<i>Chironomus riparius</i> (árvaszúnyog)	4 μM (910 μg/L)	72 óra	kelési siker csökkenése	Ozáez et al. (2014)
<i>Oryzias latipes</i> (japán medaka)	2,7 μM (620 μg/L)	21 nap	kelési siker csökkenése	Coronado et al. (2008)
<i>Carassius auratus</i> (aranyhal)	2,2 μM (500 μg/L)	7 nap	növekedett a glutation-S-transzferáz aktivitása és a glutation mennyisége, míg a szuperoxid-dizmutáz és a kataláz aktivitása csökkent	Liu et al. (2015b)

### 3.3.2. 4-metilbenzilidén kámfor (4MBC)

A 4MBC (3. ábra) elnevezésére szintén számos szinonima létezik, mint pl. enzacamén, Eusolex 6300. A 4-MBC egy kámfor származék, a kámfor két gyűrűvel rendelkező monoterpén keton, mely széleskörűen megtalálható növényekben ([http8](#); [http9](#)). A vegyület az UVB tartományban képes fényt elnyelni (Santos et al., 2012). Évente az Európai Unióban 10 és 100 tonna közötti mennyiségben gyártják, illetve forgalmazzák ([http10](#)).



3. ábra: A 4-metilbenzilidén kámfor szerkezeti képlete (forrás: [http11](#))

A 4MBC felhasználásának következtében bekerül a szennyvizekbe, illetve különböző környezeti mátrixokba. Szennyvizek esetében Svájcban mérték a legmagasabb 4-MBC koncentrációt mind befolyó (25,6 nM; 6,5 µg/L), mind kifolyó (10,6 nM; 2,7 µg/L) szennyvízben (Balmer et al., 2005). A vegyület szennyvíziszapban is gyakran kimutatható (Ramos et al., 2016). Kezelt szennyvíziszapban maximálisan 4,98 µg/g dw koncentrációban volt jelen, szintén Svájcban (Plagellat et al., 2006).

Rodil és Moeder (2008) 0,58 nM (148 ng/L) koncentrációban mutatták ki a 4MBC-t egy németországi tóból. Folyóvízben ennél alacsonyabb koncentrációban fordul elő, a svájci Glattfolyóban 0,067 nM (17 ng/L) koncentrációt mértek (Fent et al., 2010).

A 4MBC élőlényekben is felhalmozódhat. Buser és mtsai (2006) sebes pisztrángban 1,8 µg/g lipid koncentrációban mutatták ki. A halak olyan svájci folyókból származtak, melyek szennyvíz-bevezetővel rendelkeztek. A pisztrágon kívül egy spanyolországi folyóból származó márna fajban (*Barbus graellsii*) is kimutatták e vegyületet (2,7 ng/g dw) (Gago-Ferrero et al., 2015). A 4MBC emlősökben is felhalmozódhat. A Brazília keleti partja mentén élő *Pontoporia blainvillei* és *Sotalia guianensis* delfinekben a maximális mért koncentrációk 855 ng/g lipid, illetve 570 ng/g lipid értéknek megfelelően alakultak (Alonso et al., 2015).

A 4MBC állatokon kívül emberben is előfordul. Egy vizsgálat során átlagosan 22,12 ng/g lipid koncentrációban mutatták ki anyatejből (Schlumpf et al., 2010).

*In vitro* vizsgálatok eredményei alapján bebizonyosodott, hogy a 4MBC több, különböző ED hatással is rendelkezik. Klann és mtsai (2005) hím karmosbékákból (*Xenopus laevis*) származó májsejtekkel vizsgálták, hogy a 4MBC hatására megváltozik-e a sejtekben az ER-t kódoló gén átíródásának mértéke. 36 órás inkubációt követően a 4MBC 0,1  $\mu$ M (25,4  $\mu$ g/L) koncentrációban szignifikánsan növelte a génátíródás mértékét a kontrollhoz képest. Az indukció mértéke megegyezett a pozitív kontroll E2 (1 nM) által kiváltott hatással. Schlumpf és mtsai (2001) MCF-7 mellráksejtvonalon vizsgálták a 4MBC sejtproliferatív hatását. A vegyület 3,02  $\mu$ M (768,2  $\mu$ g/L) koncentrációban 50%-kal növelte az MCF-7 mellráksejtek szaporodását. Kunz és Fent (2006) rekombináns élesztő tesztben vizsgálva megállapították, hogy a 4MBC antiösztrogén ( $IC_{50}$ = 87,3  $\mu$ M; 22,2 mg/L) és antiandrogén ( $IC_{50}$ = 11,8  $\mu$ M; 3 mg/L) hatással is rendelkezik.

A 4MBC ED hatását *in vivo* tesztekben is vizsgálták. Long-Evans patkányokkal végzett 4 napos etetéses vizsgálat során szignifikánsan növelte a patkányok méhtömegét 119 mg/kg/nap dózisban (Schlumpf et al., 2001). Sprague–Dawley patkányokkal végzett krónikus etetéses vizsgálatban (3 hónap) a 4MBC szintén szignifikánsan növelte a méh tömegét 250 mg/nap dózisban. Ezenkívül 57,5 mg/nap dózisban az endometrium vastagságát szignifikánsan csökkentette, míg az endometrium epitélium vastagságát szignifikánsan növelte (Seidlová-Wuttke et al., 2006). A méhtömeg növekedése a vegyület ösztrogén hatásával hozható összefüggésbe. A 4MBC a neuroendokrin rendszerre is hatást gyakorol. Hím Wistar patkányokat 2, illetve 5 napon keresztül 2 mg/ttkg/nap dózissal kezelve a LH és a follikuluszstimuláló hormon (FSH) szignifikáns csökkenését tapasztalták a vérérumban mindkét kezelési időtartam esetében (Carou et al., 2008). A 4MBC neuroendokrin rendszert befolyásoló hatása egyes életszakaszokban eltérő módon jelentkezhet. Vemhes Wistar patkányokat 100 mg/ttkg/nap dózissal kezelve a hím utódok LH szintje szignifikánsan csökkent a pubertás előtti (15 napos), illetve szignifikánsan nőtt a pubertás alatti (30 napos) időszakban (Carou et al., 2009).

A 4MBC az agonista és antagonistá ED hatáson túl toxikusnak bizonyult vízi szervezetekre (4. táblázat). Algák és tengeri sün lárvák növekedését gátolta (Paredes et al., 2014; Sieratowicz et al., 2011), a *Siriella armata* rákfaj, a *Daphnia magna* és a *Tetrahymena thermophila* esetében pusztulást, illetve immobilizációt okozott (Gao et al., 2013; Paredes et al., 2014; Sieratowicz et al., 2011). A 4MBC kifolyó szennyvízben 2,7  $\mu$ g/L koncentrációban is előfordulhat (Balmer et al., 2005). Mivel a vegyület már 1  $\mu$ g/L koncentrációban is jelentősen befolyásolta az oxidatív sejtválaszt a *T. thermophila* esetében (Gao et al., 2013), így elképzelhető, hogy a 4MBC környezetileg releváns koncentrációban kockázatot jelenthet a vízi élőlényekre.

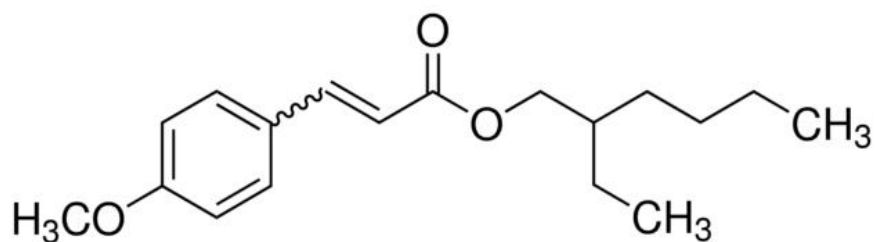


4. táblázat: A 4-metilbenzilidén kámfor káros hatásai különböző ökotoxikológiai tesztszervezeten

Tesztszervezet	Koncentráció	Kitettség időtartama	Hatás	Hivatkozás
<i>Isochrysis galbana</i> (alga)	IC <sub>50</sub> = 0,67 μM (171 μg/L)	72 óra	növekedési ráta csökkenés	Paredes et al. (2014)
<i>Desmodesmus subspicatus</i> (alga)	IC <sub>50</sub> = 30,1 μM (7,66 mg/L)			Sieratowicz et al. (2011)
<i>Tetrahymena thermophila</i> (csillós egysejtű)	3,9 μM (1 mg/L)	6 óra	szignifikánsan csökkent az életképesség	Gao et al. (2013)
	EC <sub>50</sub> = 20 μM (5,1 mg/L)	24 óra	szaporodás gátlás	
	4 nM (1 μg/L)		kataláz enzim aktivitás szignifikáns növekedése	
<i>Paracentrotus lividus</i> (tengeri süni) lárva	IC <sub>50</sub> = 3,4 μM (854 μg/L)	48 óra	növekedés gátlás	Paredes et al. (2014)
<i>Potamopyrgus antipodarum</i> (vízi csiga faj)	EC <sub>50</sub> = 4,6 μM (1,17 mg/L)	56 nap	egyedenként létrehozott embriószám növekedése	Schmitt et al. (2008)
<i>Siriella armata</i> (rákfaj) lárva	IC <sub>50</sub> = 0,76 μM (193 μg/L)	96 óra	pusztulás	Paredes et al. (2014)
<i>Daphnia magna</i> (nagy bolharák)	IC <sub>50</sub> = 3,14 μM (800 μg/L)	48 óra	immobilizáció	Sieratowicz et al. (2011)
	0,79 μM (200 μg/L)	21 nap	szignifikánsan rövidebb testhossz	

### 3.3.3. Etilhexil-metoxicinnamát (EHMC)

Az EHMC (4. ábra) egy fahéjsav származék, mely 9 szinonimája közül a leggyakrabban a 2-etilhexil-4-metoxicinnamát, oktil-metoxicinnamát és oktinoxát elnevezésekkel találkozhatunk (http12; http13). A vegyület az UVB tartományban képes abszorbeálni a fényt (Park et al., 2017). Évente 1000 és 10000 tonna közötti mennyiségben kerül előállításra vagy forgalmazásra az Európai Unióban (http14).



4. ábra: Az etilhexil-metoxicinnamát szerkezeti képlete (forrás: <http15>)

Az EHMC gyakran kimutatható a szennyvizekben (Ramos et al., 2016). Szennyvízbefolyóban 0,17  $\mu\text{M}$  (49,74  $\mu\text{g/L}$ ) (Kupper et al., 2006), míg szennyvízkifolyóban 1,7 nM (505 ng/L) (Tsui et al., 2014) maximális koncentrációt mértek. Kezelt szennyvíziszapban 4689 ng/g dw koncentrációban fordult elő maximálisan (Langford et al., 2015).

A Bagger-tóból 0,1 nM (33 ng/L) koncentrációban mutatták ki az EHMC-t (Rodil & Moeder 2008), míg egy erősen szennyezett japán folyóban 3,6 nM (1,04  $\mu\text{g/L}$ ) koncentrációt mértek (Kameda et al., 2011). Folyami üledékben 101 ng/g dw (Kameda et al., 2011), míg tengeri üledékben (Adriai-tenger) 10,4 ng/g (Combi et al., 2016) koncentrációban fordult elő maximálisan. Becslések szerint 154 kg EHMC akkumulálódik évente az Adriai-tenger üledékében (Combi et al., 2016).

Az EHMC élőlényekben is képes felhalmozódni (5. táblázat), legmagasabb koncentrációban a *Mytilus galloprovincialis* kagylóból (1765 ng/g dw) mutatták ki (Groz et al., 2014). Az EHMC biomagnifikációjára utalhat, hogy a vegyület vízi madarakban és vízi emlősökben is előfordult (Alonso et al., 2015; Fent et al., 2010).

5. táblázat: Az etilhexil-metoxicinnamát előfordulása élőlényekben

Élőlény	Koncentráció	Hivatkozás
Vándorkagyló ( <i>Dreissena polymorpha</i> )	150 ng/g lipid	Fent et al. (2010)
Kagyló faj ( <i>Mytilus galloprovincialis</i> )	1765 ng/g dw	Groz et al. (2014)
Bolharák ( <i>Gammarus sp.</i> )	133 ng/g lipid	Fent et al. (2010)
Andalúziai márna ( <i>Luciobarbus sclateri</i> )	241,7 ng/g dw	Gago-Ferrero et al. (2015)
Európai harcsa ( <i>Silurus glanis</i> )	30,4 ng/g dw	Gago-Ferrero et al. (2015)
Sebes pisztráng ( <i>Salmo trutta fario</i> )	205 ng/g lipid	Fent et al. (2010)
Fejes domolykó ( <i>Squalius cephalus</i> )	79 ng/g lipid	Fent et al. (2010)
Márna ( <i>Barbus barbus</i> )	337 ng/g lipid	Fent et al. (2010)
Európai angolna ( <i>Anguila anguila</i> )	30 ng/g lipid	Fent et al. (2010)
Atlanti tőkehal ( <i>Gadus morhua</i> )	36,9 ng/g	Langford et al. (2015)
Kormorán ( <i>Phalacrocorax sp.</i> )	701 ng/g lipid	Fent et al. (2010)
Delfin faj ( <i>Pontoporia blainvillei</i> )	250 ng/g lipid	Alonso et al. (2015)
Delfin faj ( <i>Sotalia guianensis</i> )	545 ng/g lipid	Alonso et al. (2015)

Az EHMC anyatejben is megjelenhet. Egy vizsgálat során 54 anyatejmintából 42-ben, átlagosan 27,5 ng/g lipid koncentrációban fordult elő (Schlumpf et al., 2010).

Az EHMC *in vitro* tesztekben ED hatásának bizonyult. Rekombináns élesztő tesztben androgén ( $EC_{50}$ = 10,1 mM; 2933 mg/L), antiösztrogén ( $IC_{50}$ = 4,3 mM; 1249 mg/L) és antiandrogén ( $IC_{50}$ = 312  $\mu$ M; 90,6 mg/L) hatást mutatott (Kunz & Fent 2006). Az MCF-7 mellráksejtek proliferációját 2,37  $\mu$ M (688  $\mu$ g/L) koncentrációban 50%-kal növelte (Schlumpf et al., 2001).

*In vivo* tesztekben is vizsgálták az EHMC ED hatását (6. táblázat). Zebradánio tesztorganizmokban a vegyület környezetileg releváns koncentrációban (2,2  $\mu$ g/L) változást idézett elő egyes hormonháztartáshoz kapcsolódó gének átíródásában (Zucchi et al., 2011). A kapott eredmények alapján az EHMC ösztrogén, antiösztrogén, androgén, illetve antiandrogén hatást is kifejthet halakban. Az EHMC patkány kísérletekben is ED hatásának bizonyult. Befolyásolta pl. ivarszervek tömegét (Axelstad et al., 2011; Schlumpf et al., 2001), hormonok szintjét (Axelstad et al., 2011), illetve hormonháztartáshoz kapcsolódó gének átíródását (Seidlová-Wuttke et al.,

2006). Axelstad és mtsai (2011) vizsgálata rámutatott arra, hogy EHMC kezelt anyaállatok utódaira is káros hatással lehet a vegyület. A patkány *in vivo* tesztek alapján az EHMC ösztrogén, antiösztrogén és antiandrogén hatással rendelkezhet.

6. táblázat: Az etilhexil-metoxicinnamát hormonháztartást megzavaró hatására irányuló *in vivo* vizsgálatok

Tesztorganizmus	Koncentráció	Kitétség időtartama	Hatás	Hivatkozás
<b>Zebradánio (<i>Danio rerio</i>) felnőtt</b>	2,2 µg/L	14 nap	<i>era</i> átíródás növekedése az egész testben; <i>era</i> és <i>erβ</i> átíródás csökkenése az agyban; <i>ar</i> átíródás csökkenése a májban; <i>hsd17b3</i> átíródás csökkenése az egész testben	Zucchi et al. (2011)
	890 µg/L		<i>erβ</i> átíródás növekedése az egész testben és a májban; <i>ar</i> átíródás csökkenése az egész testben, illetve növekedése az agyban; <i>cyp19b</i> átíródás növekedése az agyban	
<b>Long-Evans patkány</b>	EC <sub>50</sub> = 934 mg/kg/nap	4 nap	méhtömeg növekedés	Schlumpf et al. (2001)
<b>Sprague–Dawley patkány</b>	57,5 mg/nap	3 hónap	endometrium vastagság csökkenése, míg az endometrium epitélium vastagság növekedése; <i>era</i> , <i>pr</i> és <i>igfl</i> átíródás növekedése a méhben	Seidlová-Wuttke et al. (2006)
<b>Wistar patkány 16 napos hím utód</b>	500 mg/ttkg/nap	anyaállat kezelése a vemhesség 7. napjától	tesztoszteron szint csökkenése	Axelstad et al. (2011)
	750 mg/ttkg/nap		csökkent a here tömege	
1000 mg/ttkg/nap	csökkent a here és a prosztata tömege			
<b>Wistar patkány 28 napos nőstény utód</b>	500 mg/ttkg/nap		17β-ösztadiol és progeszteron szint csökkenése	

Jelmagyarázat: *era*: α-típusú ösztrogén receptort kódoló gén; *erβ*: β-típusú ösztrogén receptort kódoló gén; *ar*: androgén receptort kódoló gén; *hsd17b3*: 17β-hidroxisztteroid-dehidrogenáz 3 enzimet kódoló gén; *cyp19b*: P450 aromatáz B-t kódoló gén; *pr*: progeszteron receptort kódoló gén; *igfl*: inzulinszerű növekedési faktor 1-et kódoló gén

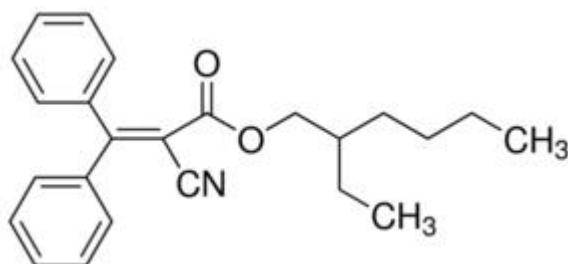
Az EHMC ED hatásán túl egyéb toxikus hatásokat is gyakorol az élővilágra (7. táblázat). Pl. gátolta algák, illetve tengeri sün lárvák növekedését (Paredes et al., 2014; Sieratowicz et al., 2011), továbbá fejlődési rendellenességeket okozott zebradánió embriókon (Kaiser et al., 2012). Ezenkívül hátrányosan befolyásolta a *Potamopyrgus antipodarum* vízi csiga szaporodását, mivel 400 µg/kg dw koncentrációban szignifikánsan csökkentette az egyedenként létrehozott embriók számát (Kaiser et al., 2012). Ezen eredmény aggodalomra adhat okot, mivel a szakirodalom szerint számos élőlényben (többek között a szintén puhatestű kagylóban) megtalálható az EHMC nagyságrendileg hasonló koncentrációban (Fent et al., 2010; Gago-Ferrero et al., 2015; Groz et al., 2014; Langford et al., 2015).

7. táblázat: Az etilhexil-metoxicinnamát vízi tesztszervezetekre gyakorolt káros hatásai

Tesztszervezet	Koncentráció	Kitétség időtartama	Hatás	Hivatkozás
<i>Isochrysis galbana</i> (alga)	IC <sub>50</sub> = 0,26 µM (75 µg/L)	72 óra	növekedési ráta csökkenés	Paredes et al. (2014)
<i>Desmodesmus subspicatus</i> (alga)	IC <sub>10</sub> = 0,24 µM (70 µg/L)			Sieratowicz et al. (2011)
<i>Paracentrotus lividus</i> (tengeri sün) lárva	IC <sub>50</sub> = 0,98 µM (284 µg/L)	48 óra	növekedés gátlás	Paredes et al. (2014)
<i>Potamopyrgus antipodarum</i> (vízi csiga faj)	400 µg/kg dw	56 nap	egyedenként létrehozott embriószám szignifikáns csökkenése	Kaiser et al. (2012)
<i>Melanoides tuberculata</i> (vízi csiga faj)	10 mg/kg dw	28 nap		
<i>Siriella armata</i> (rákfaj) lárva	IC <sub>50</sub> = 0,69 µM (199 µg/L)	96 óra	pusztulás	Paredes et al. (2014)
<i>Daphnia magna</i> (nagy bolharák)	IC <sub>50</sub> = 1,96 µM (570 µg/L)	48 óra	immobilizáció	Sieratowicz et al. (2011)
<i>Danio rerio</i> (zebradánió) embrió	1000 mg/kg dw	48 óra	fejlődési rendellenességek száma szignifikánsan növekedett, pusztulás nem volt	Kaiser et al. (2012)

### 3.3.4. Oktokrilén (OC)

Az oktokrilén (OC) – másnéven 2-etilhexil 2-ciano-3,3-difenil-2-propenoát, illetve 2-etilhexil 2-ciano-3,3-difenilakrilát – egy akrilsav származék (http16; http17), mely szerkezeti képlete az 5. ábrán látható. A vegyület mind az UVB, mind az UVA tartományban képes a fényt elnyelni (Park et al., 2017). Az Európai Unióban évente 1000 és 10000 tonna közötti mennyiségben gyártják, illetve forgalmazzák (http18).



5. ábra: Az oktokrilén szerkezeti képlete (forrás: http19)

Az OC gyakori szennyező a szennyvizekben (Ramos et al., 2016). Szennyvízbefolyóban 33,2 nM (12 µg/L) (Balmer et al., 2005), míg szennyvízkifolyóban 19,4 nM (7 µg/L) maximális koncentrációban mutatták ki (Langford et al., 2015). Szennyvíziszapban szintén magas koncentrációban van jelen a vegyület. Kezelt szennyvíziszapban 41610 ng/g dw koncentrációban fordult elő maximálisan (Langford et al., 2015).

Az OC jelenlétét felszíni vizekben is igazolták. A Cospudener-tóban 0,69 nM (250 ng/L), míg a Parthe-folyóban 0,04 nM (16 ng/L) koncentrációt mértek (Rodil & Moeder 2008). Az Ebro-folyó üledékében 2400 ng/g dw OC koncentrációt mutattak ki (Gago-Ferrero et al., 2011). Az Adriai-tenger üledékében az OC fordult elő a legmagasabb koncentrációban (40,7 ng/g) a vizsgált UV-szűrők közül. Évente kb. 487 kg OC halmozódik fel az Adriai-tenger üledékében (Combi et al., 2016).

A felszíni vizekben, üledékben akumulálódó OC bekerül a vízi élőlények szervezetébe is (8. táblázat). Pl. jelentős koncentrációt ért el az atlanti tőkehalban (11875 ng/g), illetve egyes delfin fajokban (11130 ng/g lipid) (Alonso et al., 2015; Langford et al., 2015). Ezenkívül az OC-t vadmadarak (pl. fehér gólya, dankasirály) tojásából is kimutatták (Molins-Delgado et al., 2017).

8. táblázat: Az oktokrilén előfordulása élőlényekben

Élőlény	Koncentráció	Hivatkozás
Kagyló faj ( <i>Mytilus galloprovincialis</i> )	3992 ng/g dw	Groz et al. (2014)
Garnélarák ( <i>Pandalus borealis</i> )	23,1 ng/g	Langford et al. (2015)
Andalúziai márna ( <i>Luciobarbus sclateri</i> )	30,4 ng/g dw	Gago-Ferrero et al. (2015)
Európai harcsa ( <i>Silurus glanis</i> )	25,7 ng/g dw	Gago-Ferrero et al. (2015)
Sebes pisztráng ( <i>Salmo trutta fario</i> )	2400 ng/g lipid	Buser et al. (2006)
Európai angolna ( <i>Anguilla anguilla</i> )	30 ng/g dw	Gago-Ferrero et al. (2015)
Atlanti tőkehal ( <i>Gadus morhua</i> )	11875 ng/g	Langford et al. (2015)
Fehér gólya ( <i>Ciconia ciconia</i> ) tojás	26,6 ng/g dw	Molins-Delgado et al. (2017)
Dankasirály ( <i>Chroicocephalus ridibundus</i> ) tojás	65,2 ng/g dw	Molins-Delgado et al. (2017)
Delfin faj ( <i>Pontoporia blainvillei</i> )	11130 ng/g lipid	Alonso et al. (2015)
Delfin faj ( <i>Sotalia guianensis</i> )	8310 ng/g lipid	Alonso et al. (2015)

Az OC anyatejben is felhalmozódhat, Schlumpf és mtsai (2010) vizsgálatukban átlagosan 30,18 ng/g lipid koncentrációt mértek.

Az OC ED hatását eddig még kevesen vizsgálták *in vitro* és *in vivo* tesztekben. Rekombináns élesztő tesztben androgén ( $EC_{50}= 627 \mu\text{M}$ ; 226,7 mg/L), antiösztrogén ( $IC_{50}= 2570 \mu\text{M}$ ; 929 mg/L) és antiandrogén ( $IC_{50}= 24,5 \mu\text{M}$ ; 8,86 mg/L) hatást mutatott (Kunz & Fent 2006). Ezenkívül felnőtt zebradániók heréjében 0,58  $\mu\text{M}$  (209  $\mu\text{g/L}$ ) OC szignifikánsan növelte a *hsd17b3* gén átíródását 16 nap expozíciót követően (Blüthgen et al., 2014).

Az OC élőlényekre gyakorolt toxicitásáról szintén kevés információval rendelkezünk. Blüthgen és mtsai (2014) felnőtt zebradániókon és zebradánió embriókon vizsgálták a hatását. A felnőtt zebradániók 0,06  $\mu\text{M}$ , 0,58  $\mu\text{M}$  és 1,06  $\mu\text{M}$  (22  $\mu\text{g/L}$ , 209  $\mu\text{g/L}$  és 383  $\mu\text{g/L}$ ), míg az embriók 0,19  $\mu\text{M}$ , 0,81  $\mu\text{M}$  és 2,56  $\mu\text{M}$  (69  $\mu\text{g/L}$ , 293  $\mu\text{g/L}$  és 925  $\mu\text{g/L}$ ) OC koncentrációnak voltak kitéve. A vizsgált koncentrációban a vegyület nem bizonyult toxikusnak sem a felnőtt halakra, sem az embriókra, továbbá nem befolyásolta a kelési sikert. Transzkriptomikai analízis segítségével azonban kimutatták, hogy 1,06  $\mu\text{M}$  (383  $\mu\text{g/L}$ ) OC 16 nap expozíciót követően, a felnőtt zebradániók agyában, illetve májában szignifikánsan befolyásolta 628, illetve 136 gén



átíródását, melyek főként a fejlődés, a sejtbeli folyamatok, illetve a metabolizmus szabályozásában vesznek részt.

A szakirodalmi adatok alapján az OC a környezetben mértnél magasabb koncentrációkban okozott *in vitro* és *in vivo* ED, illetve egyéb toxikus hatást.

A következő alfejezetekben szennyezőanyagok biológiai hatásának mérésére alkalmas riporter gének, illetve tesztszervezetek kerülnek bemutatásra.

### **3.4. Bioripporter tesztrendszerek**

A bioripporter olyan élő szenzorok, melyek a toxikus vegyületek jelenlétét jelzik. Bioripporterként mind prokarióta, mind eukarióta sejtek szolgálhatnak, melyek a biológiai hatást leggyakrabban fluoreszcencia, színreakció vagy biolumineszcencia segítségével jelzik. E folyamatok kialakulásában a sejtek riporter génjei játszanak szerepet (Xu et al., 2013). A bioripporter tesztrendszerek kiválóan használhatóak a szakirodalomban felsorolt vegyi anyagok és azok bomlástermékeinek biológiai hatásmérésére, ezáltal a környezetvédelmi gyakorlat számára is hasznos eszközt jelentenek.

#### **3.4.1. Fluoreszcenciáért felelős riporter gén**

A zölden fluoreszkáló protein (GFP) egy fotoprotein, melyet az *Aequorea victoria* nevű medúzából származó *gfp* gén kódol (Shaner et al., 2005). A zöld fluoreszkáló fény létrejöttéhez a GFP fluorofór részét UV vagy kék fénnel kell gerjeszteni, azonban szubsztrát hozzáadására nincs szükség (Ehrig et al., 1995; Hever & Belkin 2006). A *gfp* gént széleskörűen alkalmazzák eukariótákban is, azonban az alkalmazhatóságot nehezítheti, hogy az eukarióta sejtben előfordulhatnak természetes fluoreszkáló vegyületek, melyek révén magasabb lesz a háttérfluoreszcencia (Xu et al., 2013). Fluoreszcens bioripporter tesztszervezet pl. a nitrát jelenlétét jelző *E. coli* DH5 $\alpha$  törzs, melyben a nitrát-reduktáz rendszer promóter régióját kapcsolták össze a *gfp* génnel (Taylor et al., 2004).

#### **3.4.2. Színreakcióért felelős riporter gén**

Színreakción alapuló tesztrendszerekben gyakran az *E. coli* baktériumból származó *lacZ* gént alkalmazzák riporter génként. A *lacZ* gén a  $\beta$ -galaktozidáz enzimet kódolja, mely  $\beta$ -galaktozid tartalmú diszacharidokat képes monoszacharidokká hidrolizálni. A *lacZ* gén alapú bioripporter esetében a  $\beta$ -galaktozidáz enzim szubsztrátjaként o-nitrofenil- $\beta$ -D-galaktopiranozidot alkalmaznak, melyet az enzim színes terméké hidrolizál (Xu et al., 2013). *LacZ* gént alkalmazó bioripporter pl. a Routledge és Sumpter (1996) által kialakított rekombináns *Saccharomyces cerevisiae* törzs (a YES teszt néven ismert vizsgálat tesztszervezete), mely az

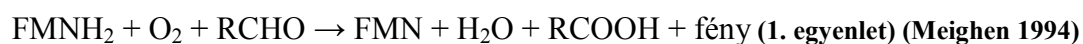
ösztrogén hatás vizsgálatára alkalmas. A törzs genomjába a hER $\alpha$ -t kódoló gént integrálták, továbbá ösztrogén válasz elemeket (ERE – Estrogen Response Elements) és a *lacZ* gént tartalmazó plazmidot is bejuttattak a sejtbe. A hER $\alpha$ -val komplexet alkotó vegyületek a plazmid ERE régiójához kapcsolódva indukálják a *lacZ* gén átíródását. A  $\beta$ -galaktozidáz enzim színreakciót eredményező szubsztrátját a rendszerhez adva a színintenzitás mértékéből következtethetünk az ösztrogén hatás erősségére (Routledge & Sumpter 1996).

### 3.4.3. Biolumineszcenciáért felelős riporter gének

A biolumineszcencia egy adott élőlényben lejátszódó kémiai folyamat során generált fény. A kémiai reakciót a luciferáz enzim katalizálja, mely a luciferin nevű szubsztrátját oxidálva gerjesztett állapotú molekulát hoz létre. E molekula alapállapotába való visszatérése során fényt bocsát ki. A biolumineszcenciáért felelős riporter gének származhatnak biolumineszcens baktériumokból (*lux* gének), illetve a *Photinus pyralis* nevű szentjánosbogárból (*luc* gén) (Meighen 1991; Xu et al., 2013).

A *P. pyralis* nevű szentjánosbogárból származó *luc* gén a luciferáz enzimet kódolja, mely katalizálja a redukált luciferin oxidációját ATP, Mg<sup>2+</sup> ion és O<sub>2</sub> jelenlétében. A reakció során sárgás-zöld színű, 562 nm hullámhosszú fény keletkezik (Hastings et al., 1953; McElroy & Rainwater 1948; Seliger & McElroy 1964; Xu et al., 2013). A *luc* génen alapuló biotesztek habár gyorsak és érzékenyek, hátrányuk, hogy a luciferint külsőleg kell a reakcióhoz adagolni (Close et al., 2009; Xu et al., 2013). *Luc* génen alapuló bioriporter pl. a *Staphylococcus aureus* RN4220-as törzs, mely bizonyos fémek kimutatására alkalmas (Tauriainen et al., 1998).

A bakteriális biolumineszcenciát a *luxCDABE* operon szabályozza. A luciferáz enzim a reakció során oxidálja a redukált riboflavin foszfátot (FMNH<sub>2</sub>) és egy hosszú szénláncú aldehidet O<sub>2</sub> jelenlétében. A reakció (1. egyenlet) végeredményeképpen kékes-zöld színű, 490 nm hullámhosszú fény keletkezik (Meighen 1994; Xu et al., 2013).



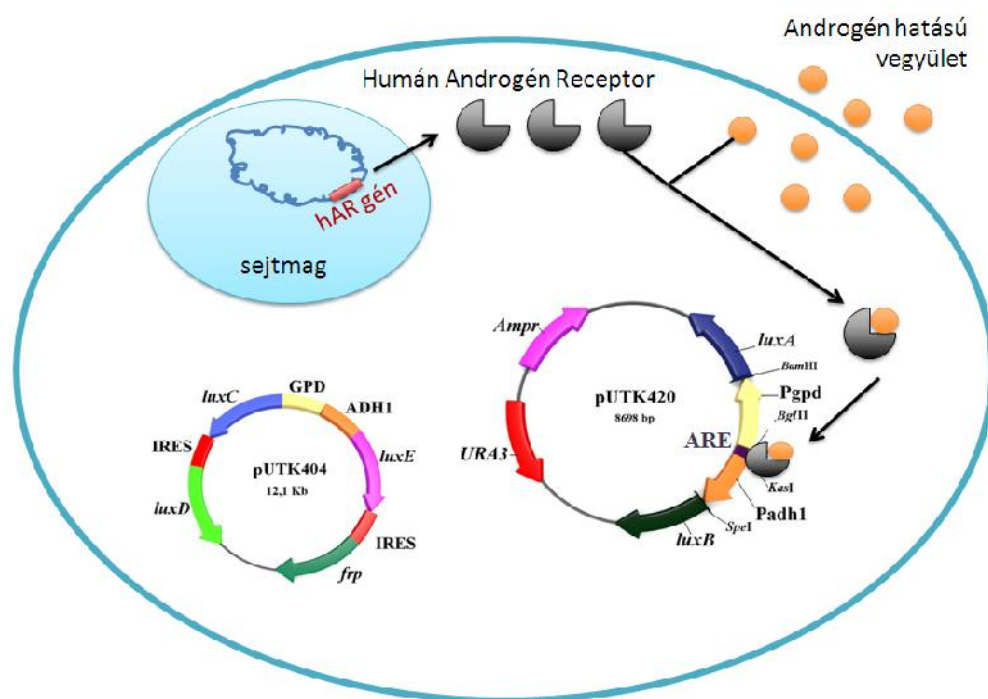
A luciferáz enzimet a *luxA* és *luxB* gének kódolják, a *luxC*, *luxD* és *luxE* gének az aldehid szintéziséért felelnek (Meighen 1994; Xu et al., 2013).

A bakteriális *luxCDABE* génkazettán alapuló tesztrendszerek előnye a többi bioriporter tesztrendszerrel szemben, hogy a biolumineszcencia létrejöttéhez nem igénylik külső szubsztrát hozzáadását, nincs szükség gerjesztő fényforrásra, továbbá a keletkező biolumineszcencia könnyen mérhető, és napok helyett néhány órán belül meghatározható (Sanseverino et al., 2005).

Bakteriális *lux* géneken alapuló bioriporterek pl. a hormonhatás mérésére szolgáló *Saccharomyces cerevisiae* BLYES (Bioluminescent Yeast Estrogen Screen) és BLYAS (Bioluminescent Yeast Androgen Screen) törzsek, illetve a sejttoxikus hatást mérő *S. cerevisiae* BLYR (Bioluminescent Yeast Reporter) törzs (Eldridge et al., 2007; Sanseverino et al., 2005). E törzsek a 3.4.4, a 3.4.5 és a 3.4.6 alfejezetekben részletes bemutatásra kerülnek, mivel doktori munkámhoz bioriporter tesztstruktúrák szolgáltatók.

### 3.4.4. *Saccharomyces cerevisiae* BLYAS

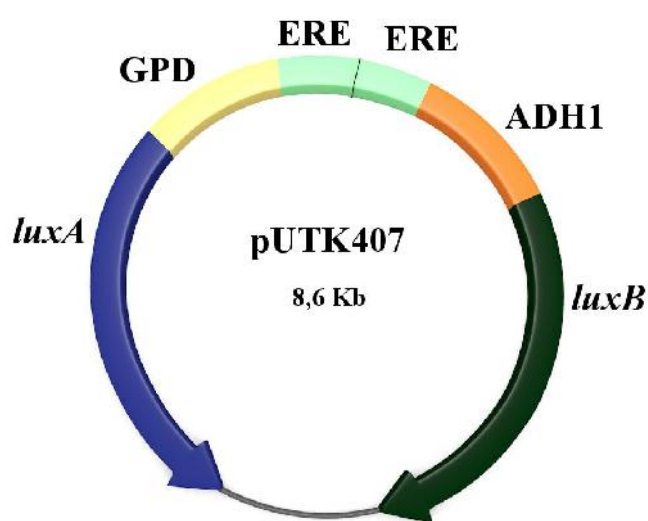
Az androgén aktivitás méréséhez a *S. cerevisiae* BLYAS tesztstruktúrákat alkalmaztam. E törzs genomjába a hAR gént ültették. Ezenkívül két plazmidot (pUTK420 és pUTK404) is bejuttattak a törzsbe, melyeken biolumineszcenciáért felelős gének találhatók. A pUTK420 plazmidon úgynevezett androgén válasz elemek (ARE – Androgen Response Elements), a GPD és ADH1 divergens promóterek, illetve a *luxA* és *luxB* gének találhatók. A pUTK404 plazmidon az aldehid szintézishez szükséges *luxCDE* gének és a flavin oxidoreduktáz enzimet kódoló *frp* gén található. Amennyiben valamely molekula képes bejutni a sejtbe és a hAR-hoz kapcsolódni, a receptorral komplexet képez. Két receptor-ligand komplex dimert alkot és a plazmidon található androgén válasz elemekhez kapcsolódva indukálja a fénykibocsátásért felelős gének átíródását (6. ábra). Androgén hatás esetében nő a kontrollhoz képest a biolumineszcencia (Eldridge et al., 2007).



6. ábra: A *Saccharomyces cerevisiae* BLYAS törzs működésének sematikus ábrája (Eldridge et al., 2007 alapján)

### 3.4.5. *Saccharomyces cerevisiae* BLYES

Az ösztrogén hatás mérésére a *S. cerevisiae* BLYES törzs szolgál. E törzs kromoszómájába a hER $\alpha$ -t kódoló gént ültették. A biolumineszcenciáért felelős gének a pUTK404 és pUTK407 plazmidokon találhatóak. A pUTK404 plazmidon az aldehid szintézishez szükséges *luxCDE* gének és a flavin oxidoreduktáz enzimet kódoló *frp* gén található. A pUTK407 plazmidon (7. ábra) ösztrogén válasz elemek (ERE), a GPD és ADH1 divergens promóterek, illetve a *luxA* és *luxB* gének találhatóak. A BLYES törzs működési elve megegyezik a BLYAS törzsével, azaz két receptor-ligand komplex az ösztrogén válasz elemekhez kapcsolódva indukálja a biolumineszcenciáért felelős gének átíródását, így ösztrogén hatás esetében a biolumineszcencia intenzifikálódását tapasztalhatjuk (Sanseverino et al., 2005).



7. ábra: A pUTK407 plazmid felépítése Sanseverino et al. (2005) alapján

### 3.4.6. *Saccharomyces cerevisiae* BLYR

A hormonhatás mérése mellett fontos vizsgálni azt is, hogy az adott vegyület rendelkezik-e sejttoxikus hatással, mivel az befolyásolhatja a hormonhatás mérése során kapott eredményt. A sejttoxikus hatás mérésére a kontroll *S. cerevisiae* BLYR törzset alkalmaztam, melyben a fénykibocsátásért felelős gének konstitutívan íródnak át. Toxikus hatás esetén csökken a tesztorganizmus alap biolumineszcenciája (Eldridge et al., 2007).

## 3.5. Vízi ökotoxikológiai tesztszervezetek

### 3.5.1. *Aliivibrio fischeri*

Az *Aliivibrio fischeri* baktérium rendszertanilag a *Proteobacteria* törzsbe, *Gammaproteobacteria* osztályba, *Vibrionales* rendbe, *Vibrionaceae* családba és *Aliivibrio*

nemzetségbe sorolható (http20). Gram-negatív, pálcika alakú, fakultatív aerob baktérium, mely biolumineszcencia kibocsátására képes. Élőhelyeül tengervizek szolgálnak, ahol bizonyos tengeri halakat, illetve fejlábúakat kolonizálnak. A kibocsátott fény segítségével a kolonizált élőlény magához vonzhatja zsákmányát, illetve elriaszthatja a ragadozókat (Madigan et al., 2012). A *luxCDABE* géneken túl a tengeri biolumineszcens baktériumokban a *luxG* gén is megtalálható, mely a FMN redukcióját szabályozza (Nijvipakul et al., 2008). A biolumineszcencia létrejöttéhez a baktériumok megfelelően magas sejtsűrűsége szükséges, mivel a biolumineszcenciáért felelős proteinek és a luciferáz enzim működése sejtsűrűségfüggő, önindukáló folyamat. A *luxCDABEG* gének átíródását egy LUXR nevű fehérje szabályozza, illetve az acil homoszerin lakton (AHL) indukálja. A sejtek növekedésük folyamán AHL-t termelnek, mely magas sejtsűrűség esetén felhalmozódik a sejtekben. A szabályozó LUXR protein csak akkor képes az AHL-nal összekapcsolódni, amennyiben az magas koncentrációban van jelen. E két molekula komplexe aktiválja a *luxCDABEG* gének átíródását (Madigan et al., 2012).

Miután a fénykibocsátás mértéke egyenesen arányos a sejtek metabolikus aktivitásával, az enzimaktivitás gátlása esetén a biolumineszcencia is arányosan csökken. Ezen elven alapul az akut *Aliivibrio fischeri* lumineszcencia gátlási teszt, melyet gyakran alkalmaznak az ökotoxikológiai vizsgálatok során, mivel gyors (csupán 5-30 perc kontaktidő szükséges), érzékeny, reprodukálható, költséghatékony és könnyen kivitelezhető módszer, ezenkívül nem igényel nagy mintatérfigatot a vizsgálat (Parvez et al., 2006).

### **3.5.2. Zebradánió (*Danio rerio*)**

A zebradánió kedvelt modellállat a fejlődésbiológia és a toxikológia tudományterületén, mivel széleskörű ismeretekkel rendelkezünk a zebradániók mindkét nemére vonatkozóan az összes életszakasz morfológiájáról, biokémiájáról és fiziológiájáról. A zebradániók további előnye a kis testméretük (2,5-4 cm), mely kedvezőbbé teszi helyigényüket és a tartási költségüket. A kisméretű embriók egyszerre nagyszámú minta vizsgálatát teszik lehetővé sejttenyésztő lemezekon vagy Petri csészékben (Hill et al., 2005). A zebradániók gyorsan, 100 napos koruk körül ivaréretté válnak (Skidmore 1965) és megfelelő tartás mellett 5-7 naponta akár 200-300 db ikrát is lerakhatnak egyszerre. Az ikrahéj és az embriók átlátszósága miatt az egyedfejlődési szakaszok könnyedén nyomon követhetőek, illetve a toxikus vegyületek hatására bekövetkező elváltozások is megfigyelhetőek (Hill et al., 2005). Ellentétben más gerinces modellállattal, a zebradánió minden szerve és szövete kifejlődik a megtermékenyítés utáni 120. órára (120 hpf – hours post fertilization) (He et al., 2014). A tüdő, prosztata és az emlőmirigyek kivételével a zebradánió szervei nagy hasonlóságot mutatnak az emlősök szerveivel anatómiai és

fiziológiai szempontból (Lewis & Eisen 2003; Moens & Prince 2002; Wilson et al., 2002). A zebradánió teljes genomszekvenciája rendelkezésünkre áll, melyből kiderül, hogy a genom 85%-os homológiát mutat a humán genommal (McCollum et al., 2011; Renier et al., 2007). A gerincesek egyedfejlődése a korai életszakaszokban nagymértékben konzervált, embriói morfológiailag nagyon hasonlítanak egymásra. A fentiek tükrében a zebradániókkal, illetve zebradánió embriókkal végzett vizsgálatok eredményei reprezentatívak lehetnek magasabbrendű állatokra és az emberre is (Hill et al., 2005).

## 4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### 4.1. Az UV-szűrő vegyületek biológiai hatásmérése

Az UV-szűrő vegyületek biológiai hatásméréséhez több módszer alkalmazására nyílt lehetőségem, melyek lehetővé tették a hormonhatás és a sejttoxikus hatás megállapítását. Az alábbiakban ezeket a módszereket ismertetem.

#### 4.1.1. Hormonhatás és sejttoxikus hatás vizsgálata bioripporter rendszerekkel

##### 4.1.1.1. Az ösztrogén, androgén és sejttoxikus hatás mérése

A *S. cerevisiae* BLYES, BLYAS és BLYR törzseket M. Eldridge és G. Sayler, a The University of Tennessee (Knoxville, Tennessee) munkatársai bocsátották a rendelkezésünkre. A törzsek szaporításához uracil és leucin szelektív ( $YMM^{ura- leu-}$ ) tápoldatot (9.2. melléklet) alkalmaztam, amelyet 5 további oldattal egészítettem ki: vitamin oldat (mely tiamint, piridoxint, pantoténsavat, inozitolt és biotin oldatot tartalmaz), 20%-os glükóz oldat, L-aszparaginsav oldat, L-treonin oldat és réz-szulfát oldat (9.2. melléklet). A  $-80^{\circ}\text{C}$ -on tárolt BLYES, BLYAS és BLYR inokulumot 30 mL tápoldatban (Growth Medium, 9.2. melléklet), 300 mL-es Erlenmeyer lombikban 24 órán keresztül inkubáltam ( $28^{\circ}\text{C}$ , 170 rpm), majd sejtsűrűségét 600 nm-en ( $OD_{600}$  – Optical Density 600) 1-re állítottam be (Sanseverino et al., 2009).

Tesztvegyületek: a  $17\beta$ -ösztradiol (CAS: 50-28-2) ( $\geq 98\%$ ),  $5\alpha$ -dihidrotesztoszteron (CAS: 521-18-6) ( $\geq 99\%$ ), 4-hidroxitamoxifen (CAS: 68392-35-8) (50:50 E:Z izomerek, analitikai standard), oktokrilén (CAS: 6197-30-4) (minősített referencia anyag) és etilhexil-metoxicinnamát (CAS: 5466-77-3) ( $\geq 98\%$ ) a Sigma-Aldrich Kft-től (Magyarország) lett beszerezve. A flutamid (CAS: 13311-84-7) (referencia standard) a Cayman Chemical Company-tól (USA), míg a benzofenon-3 (CAS: 131-57-7) ( $\geq 98\%$ ) és a 4-metilbenzilidén kámfor (CAS: 36861-47-9) ( $\geq 99\%$ ) az Alfa Aesar-tól (USA) lett rendelve. A proteináz K és az SDS (nátrium-dodecil-szulfát) a Thermo Fisher Scientific Inc.-től (USA) lett beszerezve.

Oldószerek: a metanol (CAS: 67-56-1) (99,9%) a Sigma-Aldrich Kft-től (Magyarország) míg a dimetil-szulfoxid (CAS: 67-68-5) (analitikai tisztaság) a Thermo Fischer Scientific Inc.-től (USA) lett vásárolva.

A vizsgálataimat 96-lyukú, polisztirol, lapos aljú mikrotiter lemezeken (Greiner Bio-One Hungary Kft., Magyarország) végeztem, 3 párhuzamosban ( $20\ \mu\text{L}/\text{microwell}$ ). A vizsgálni kívánt vegyületek törzsoldatából hígítási sort készítettem, felező hígításban (9.3. melléklet). A törzsoldatok és a hígítási sorok elkészítéséhez metanolt alkalmaztam hígító oldatként. Két

negatív kontrollt használtam, egyrészt a hígításhoz használt oldószert és a tesztstruktúrát tartalmazó kontrollt, másrészt csak a tesztstruktúrát tartalmazó kontrollt.

A hígítási sorok elkészítése után a beállított sejtsűrűségű tesztstruktúra 200  $\mu\text{L}$ -ét adagoltam a mikrotiter lemez megfelelő üregeibe és a lemezt  $30^{\circ}\text{C}$ -on inkubáltam 5 órán keresztül. A biolumineszcenciát (cps – counts per second) a 0. és az 5. órában mértem VictorX Multilabel Plate Reader (Perkin Elmer Inc., USA) segítségével.

Az 5. órában kapott biolumineszcencia (cps) értékeket a koncentráció ( $\mu\text{M}$ ) függvényében ábrázoltam. Meghatároztam az alap biolumineszcencia átlagának és háromszoros szórásának összege alapján számított NOEC (No-Observed-Effect Concentration – A legmagasabb, megfigyelhető hatást még nem okozó koncentráció) értéket (Microsoft Excel), illetve kiszámítottam az agonista hormon tesztek esetében az  $\text{EC}_{50}$ , míg a sejttoxicitást mérő teszt esetében az  $\text{IC}_{50}$  értékeket [GraphPad Prism 5.03. program (GraphPad Software Inc., San Diego California USA)].

#### 4.1.1.2. Az antiösztrogén és antiandrogén hatás mérése

Az antagonista hatás mérése indirekt úton történt, melyhez a 4.1.1.1 fejezetben leírt vizsgálati módszer módosítására volt szükség. A módosítást Sohoni és Sumpter (1998) által rekombináns *Saccharomyces cerevisiae* törzsre kidolgozott eljárás szerint végeztem. A vizsgálat elve, hogy a tesztstruktúrákhoz 65%-os hatást ( $\text{EC}_{65}$ ) kiváltó koncentrációban adagolt agonista E2, illetve DHT által indukált biolumineszcenciát a vizsgált vegyület képes csökkenteni antiösztrogén, illetve antiandrogén hatása révén.

A 65%-os hatásos koncentráció meghatározásához a 4.1.1.1 fejezetben leírt módszert alkalmaztam, ahol az E2 és DHT törzsoldatából 3-3 párhuzamos hígítási sort készítettem. A kapott szigmoid görbék alapján kiszámítottam a 65%-os hatást kiváltó koncentrációt mindkét vegyület esetében GraphPad Prism 5.03. programmal (GraphPad Software Inc., San Diego California USA).

A *S. cerevisiae* BLYES és BLYAS törzsekkel a szakirodalom alapján még nem végeztek antagonista teszteket, így doktori munkám során megvizsgáltam e törzsek antagonista tesztekben való alkalmazhatóságát, melyhez először az ismert antiösztrogén 4-hidroxitamoxifen (4HT) és antiandrogén flutamid (FT) vegyületekre teszteltem e törzsek érzékenységét.

A vizsgálni kívánt vegyületek hígítási sorát 3 párhuzamosban készítettem el, majd minden microwellbe az E2, illetve a DHT 65%-os hatást kiváltó koncentrációjú oldatát adagoltam (20



$\mu\text{L}/\text{microwell}$ ). A 4.1.1.1 fejezetben leírtakon túl, harmadik negatív kontrollként E2-t ( $\text{EC}_{65}$ ), illetve DHT-t ( $\text{EC}_{65}$ ), hígító oldatot és tesztstruktúrát tartalmazó kontrollt alkalmaztam. Az antiösztrogén és antiandrogén tesztek esetében szintén meghatároztam a 3 párhuzamos mérésből az átlagos NOEC és  $\text{IC}_{50}$  értékeket [GraphPad Prism 5.03. (GraphPad Software Inc., San Diego California USA) és Excel programok].

#### 4.1.2. Toxikus hatás vizsgálata vízi tesztstruktúrákon

##### 4.1.2.1. *Aliivibrio fischeri* biolumineszcencia gátlási teszt

Az *Aliivibrio fischeri* biolumineszcencia gátlási teszt egy szabványos ökotoxikológiai teszt módszer. Az MSZ EN ISO 11348 szabványcsalád segítségével a vizsgálat elvégezhető frissen előkészített, folyadékból szárított és liofilizált baktériummal is.

A módszer elve, hogy a mintát és az *A. fischeri* szuszpenzióját küvetében elegyítve meghatározzuk az *A. fischeri* fénykibocsátásának a minta hatására bekövetkező gátlását. A lumineszcencia csökkenést 5, 15 vagy 30 perc kontaktidő után mérhetjük. A gátlási értékeket egy  $f_k$  korrekciós faktorial kell korrigálni, mely a kontroll minták expozíciós időn belüli intenzitásváltozásának mértéke. Az eredmények értékeléséhez meghatározzuk a legnagyobb, 20%-nál kisebb gátlást okozó hígítási szintet, továbbá a 20, 50, illetve 80%-os gátlást okozó koncentrációkat.

A teszt érvényességi kritériuma, hogy

- 30 perces inkubáció esetén az  $f_k$  érték 0,6 és 1,8 közé essen,
- a párhuzamos meghatározások átlagtól való eltérése ne haladja meg a 3%-ot sem a kontroll, sem a teszt minták esetében,
- a referenciaként alkalmazott 3,4 mg/L koncentrációjú 3,5-diklór-fenol, 2,2 mg/L koncentrációjú  $\text{Zn}^{2+}$  ion ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  formájában) és 18,7 mg/L koncentrációjú  $\text{Cr}^{6+}$  ion (kálium-dikromát formájában) 30 perces érintkezési idő után 20-80% gátlást okozzon.

E teszt módszer korlátozó tényezőkkel is jellemezhető. Az oldhatatlan, kevésbé oldódó vagy illékony vegyületek, továbbá azok, amelyek reakcióba lépnek a hígítófolyadékkal vagy a teszt szuszpenzióval, befolyásolhatják az eredményt vagy ronthatják az eredmények reprodukálhatóságát. Erősen színes vagy zavaros minta a fényelnyelés vagy a fényszóródás miatt csökkentheti a lumineszcenciát. A teszt minta NaCl végkoncentrációja nem szabad, hogy

meghaladja a 35 g/L-es koncentrációt, a hiperozmotikus hatás elkerülése miatt (MSZ EN ISO 11348-1:2009).

A vizsgálat 3 ismétlésben és 2-2 párhuzamosban zajlott. A 3-ból 2 ismétlést liofilizált baktériummal, míg 1 ismétlést frissen előkészített baktériummal végeztem. Az *A. fischeri* DSM-7151 baktériumot – melyet az MSZ EN ISO 11348-1:2009 szabvány előírásainak megfelelő módon, -20°C-on tárolunk – a DSMZ-től (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Németország) szereztem be. A liofilizált baktériumot (Microtox<sup>®</sup> Acute Reagent, 13C4033A) a Modern Water plc-től (Nagy-Britannia) vásároltam.

A vizsgálat során a törzsoldat készítéshez 3,3 V/V % DMSO (dimetil-szulfoxid) + 2 m/V % NaCl desztillált vizes oldatát használtam, mely oldat a tesztben negatív kontrollként is szolgált. A törzsoldatból 9 tagú koncentráció sort készítettem 1:1,5 hígítási faktorial. A biolumineszcencia gátlást 30 perces kontaktidő után határoztam meg Microtox<sup>™</sup> 500 luminométer segítségével. Megállapítottam a koncentráció-válasz görbe segítségével a 20%-os és az 50%-os gátlási koncentrációt (IC<sub>20</sub> és IC<sub>50</sub>).

#### 4.1.2.2. Zebradánió (*Danio rerio*) embrió teszt (OECD 236)

Az OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development – Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet) 236-os útmutatója alapján meghatározható a szennyezőanyagok zebradánió embriókra kifejtett akut toxicitása. A teszt széleskörben alkalmazható különböző hatásmechanizmussal, oldhatósággal, illékonyssággal rendelkező vegyületek vizsgálatára. Az eljárás alapja, hogy a megtermékenyült zebradánió embriókat 96 órán keresztül exponálják a tesztvegyülettel, és 24 óránként feljegyzik az elpusztult embriók számát. A pusztulás indikátora lehet a koaguláció, a szomiták (a gerinchúr két oldalán elhelyezkedő, mezodermális eredetű összelvények, melyek többek között a gerincoszlop létrehozásáért felelősek) hiánya, a szívverés hiánya, illetve ha a farki rész nem válik el a szikhólyagtól.

A teszt módszer nem alkalmazható olyan vegyületek esetében, melyek molekulatömege  $\geq 3$  kDa, illetve molekulaszervezete nagymértékben elágazó, mert biológiai hozzáférhetőségük korlátozott.

A tesztet érvényesnek tekinthetjük, ha az alábbi feltételek teljesülnek:

- Az ikrák megtermékenyülési rátája legyen  $\geq 70\%$ .
- A vízhőmérséklet állandóan  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  legyen.

- Az embriók túlélése mind a negatív kontrollban, mind az oldószeres kontrollban legyen  $\geq 90\%$  a 96 órás vizsgálat során.
- A pozitív kontroll (4 mg/L koncentrációjú 3,4-diklóranilin) legalább 30%-os pusztulást okozzon a 96 órás expozíció alatt.
- A kelési ráta a negatív kontrollban, illetve az oldószeres kontrollban legyen  $\geq 80\%$  a 96 órás vizsgálat során.
- A 96. óra végére a negatív kontrollban és a legmagasabb vizsgált mintakonzentrációban az oldott oxigén koncentrációja legyen  $\geq 80\%$ .

A fenti feltételeken túl fontos biztosítani a teszt során, hogy a vízkeménység feleljen meg 100-300 mg/L CaCO<sub>3</sub>-nak, továbbá az oldat pH-ja 6,5-8,5 között legyen, és ne változzon 1,5 egységnél többet. A tesztvegyület törzsoldatának elkészítésénél nem ajánlott a szerves oldószerek használata. Amennyiben ez elkerülhetetlen a törzsoldat megfelelő koncentrációjának elkészítéséhez, akkor az oldószer végkoncentrációja maximum 100 µL/L lehet, és az értéke minden tesztedényben egyenlő kell, hogy legyen. Ezenkívül külön oldószeres kontroll beállítása is szükséges.

Az eredmények statisztikai értékeltségéhez legalább 5 hígítási szintet kell kialakítani, melyek maximum 2,2-es szorzóval térnek el egymástól. A koncentrációk kialakításánál érdemes figyelembe venni, hogy a legmagasabb koncentráció 100%-os pusztulást okozzon, míg a legalacsonyabb koncentrációban ne lehessen hatást megfigyelni. Koncentrációnként 20 embrió vizsgálata szükséges. A tesztet a megtermékenyülést követő 180 percen belül el kell kezdeni, a vizsgálat 24-lyukú lemezen zajlik, ahol minden lyukba 1 embrió kerül és 2 mL tesztfolyadék (OECD 2013).

A zebra-dánió embrió tesztet a Szent István Egyetem, Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet, Halgazdálkodási Tanszék munkatársai segítségével végeztem. A zebra-dániókat (1. kép) recirkulációs rendszerben (ZebTEC, Tecniplast Inc., USA) tartják standard laboratóriumi körülmények között (25°C, 525 ± 50 µS, 14 h fény, 10 h sötét periódus). A halakat naponta kétszer etetik Small Gran granulált táppal (Special Diets Services Limited International Dietex GB, Nagy-Britannia) és hetente kétszer *Artemia sp.* frissen kelt nauplius-lárvaival. A halak a tesztet megelőző nap délutánján tenyésztő akváriumba kerültek (Tecniplast S.p.a, Olaszország), így másnap reggelre egymással szinkronban rakták le az ikráikat. A megtermékenyített és egészséges ikrák leválogatása mikroszkóp segítségével történt.



**1. kép: Recirkulációs rendszerben tartott zebradániók (Forrás: SZIE Halgazdálkodási Tanszék)**

A vizsgált vegyület törzsoldatát DMSO-ban készítettem el, és 6 koncentrációt alakítottam ki recirkulációs rendszervíz segítségével. Az egyes hígításokat azonos DMSO koncentrációra egészítettem ki (250  $\mu\text{L/L}$ ). Az oldószer koncentrációja magasabb volt az útmutató által javasolt értéknél (100  $\mu\text{L/L}$ ) a hatékonyabb oldhatóság miatt. A hígításokat 3 percen keresztül szonikáltam (20%-os amplitudó, 60 Hz) (Branson Digital Sonifier S-450 102C, Emerson Industrial Automation, USA).

A zebradánió embrió tesztet az OECD 236-os útmutató (OECD 2013) alapján végeztük, azzal az eltéréssel, hogy a vizsgálat időtartamát 96 órától 120 órára növeltük. Erre azért volt szükség, hogy a kelés után bekövetkező rendellenességek is megfigyelhetők legyenek. A vizsgálatot 4 ismétlésben, koncentrációnként összesen 40 db embrióval végeztük, melyeket 10-10 embriónként helyeztünk el 24-lyukú lemezekre. Negatív kontrollként a recirkulációs rendszervíz, míg pozitív kontrollként a 3,4-diklóranilin (4 mg/L) szolgált. Ezenkívül oldószeres kontrollt is beállítottunk (250  $\mu\text{L/L}$  DMSO). Az embriókat  $27 \pm 1^\circ\text{C}$ -on inkubáltuk és 14 h világos, valamint 10 h sötét fotoperiódust biztosítottunk számukra.

Az esetleges fejlődési rendellenességeket a teszt kezdete után 24, 48, 96 és 120 órával jegyeztük fel, mely időpontok az embriogenezis utolsó 3 fejlődési szakaszát fedik le. A fejlődési rendellenességeken túl naponta feljegyeztük az elpusztult embriók számát és a 96. órában a kelési sikert is. A megfigyeléseket Leica M205FA sztereomikroszkóp (Leica Microsystems GmbH, Németország) segítségével végeztük. A hatásos koncentráció szintek meghatározása GraphPad Prism 5.03. programmal (GraphPad Software Inc., San Diego California USA) történt.

## 4.2. Biodegradációs kísérletek 5 $\alpha$ -dihidrotesztoszteronnal

Doktori munkám során a biodegradációs kísérleteket a DHT vegyülettel valósítottam meg.

### 4.2.1. Biodegradáció élő sejtekkel

A biodegradációs kísérlethez kiválasztott, a Szent István Egyetem Környezetbiztonsági és Környezettoxikológiai Tanszékének gyűjteményébe tartozó *Rhodococcus* és *Cupriavidus* törzseket az 9. táblázatban tüntettem fel. A törzseket LB agarra (9.2. melléklet) szélesztettem, majd a Petri csészéket 72 órán keresztül inkubáltam 28°C-on. Az inokulum elkészítéséhez egyetlen izolált teleppel LB tápoldatot (9.2. melléklet) oltottam be, melyet szintén 72 órán keresztül inkubáltam (28°C, 170 rpm) hűtő-fűtő rázógépből (Certomat BS-1, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Németország). A bontási kísérletben kontrollként mikrobamentes LB tápoldatot és bontási képességgel nem rendelkező *E. coli* TOP10-es törzset alkalmaztam, melyek az abiotikus vesztesség meghatározására szolgáltak. A kísérlethez 3 párhuzamos bontási rendszert állítottam be 300 mL-es Erlenmeyer lombikokban. A DHT kiindulási koncentrációja a tápoldatban 100  $\mu\text{g/L}$  (0,344  $\mu\text{M}$ ) volt. Az inokulum sejtsűrűségét 600 nm-en ( $\text{OD}_{600}$ ) 0,6-ra állítottam be. A DHT-t, inokulumot (5 mL) és LB tápoldatot (45 mL) tartalmazó lombikokat 72 órán át, 28°C-on inkubáltam és 170 rpm-mel rázattam. A 72. órában levett felülúszó és pellet minták DHT tartalmát gázkromatográfia-tömegspektrometriás (GC-MS) méréssel (4.2.3.1 fejezet), míg a felülúszó minták androgén aktivitását és sejtoxikus hatását a BLYAS és BLYR teszt (4.2.3.2 fejezet) segítségével határoztam meg.

9. táblázat: Az 5 $\alpha$ -dihidrotesztoszteron biodegradációs kísérlethez kiválasztott baktérium törzsek

Baktérium faj	Törzsjel
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	AK35
<i>Rhodococcus globerulus</i>	AK36
<i>Rhodococcus pyridinivorans</i>	AK37
<i>Rhodococcus gordoniae</i>	AK38
<i>Rhodococcus ruber</i>	AK41
<i>Rhodococcus aetherivorans</i>	AK44
<i>Rhodococcus coprophilus</i>	N774
<i>Rhodococcus pyridinivorans</i>	K402
<i>Cupriavidus basilensis</i>	BRB6A
<i>Cupriavidus basilensis</i>	ÖR16

#### 4.2.2. Biodegradáció extracelluláris kivonattal

Vizsgálataimhoz a *Rhodococcus pyridinivorans* AK37-es törzset választottuk ki, mivel a törzs teljes genom szekvenciája rendelkezésünkre állt, és számos szteroid bontásért felelős enzimet kódoló gént azonosítottak benne (*3-ketoszteroid-9 $\alpha$ -hidroxiláz*, *3-ketoszteroid- $\delta$ -dehidrogenáz*, *3-ketoszteroid-1-dehidrogenáz* és *szteroid- $\delta$ -izomeráz*) (Kriszt et al., 2012). Első lépésként 45 mL LB tápoldatot 5 mL *R. pyridinivorans* AK37 inokulummal ( $OD_{600} = 0,6$ ) oltottunk be, majd 72 órán keresztül inkubáltuk (28°C) és 170 rpm fordulatszámmal rázattuk. Ezután a tenyészetet lecentrifugáltuk (19721,52 g, 4°C, 20 perc), majd 1 mL átszűrt (0,22  $\mu$ m) felülúszót pipettáztunk steril 1,5 mL térfogatú centrifugacsövekbe, melyekben 100  $\mu$ g/L DHT koncentrációt állítottunk be. A centrifugacsöveket 28°C-on inkubáltuk 12 órán keresztül. A sejtmentes bontási vizsgálatban 3 különböző kontrollt alkalmaztunk: (1) LB tápoldatot és 100  $\mu$ g/L DHT-t tartalmazó kontrollt, (2) hősterilizéssel kezelt (121°C, 20 perc, 1 bar) extracelluláris kivonatot (Alberts et al., 2006) és (3) 1 mg/mL koncentrációjú proteináz K-val és 0,1%-os SDS-szel (sodium dodecyl sulphate) kezelt (37°C, 6 óra) extracelluláris kivonatot (Alberts et al., 2006). A (2) és (3) kontrollokban a kezelést követően 100  $\mu$ g/L DHT koncentrációt alakítottunk ki. A hősterilizés, illetve a proteináz K + SDS alkalmazása a felülúszóban jelenlévő enzimek inaktiválására szolgált.

Az enzimtermelés konstitutív vagy indukált jellegének meghatározásához SDS-PAGE (sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis) (10%-os gél) módszert (Laemmli 1970) alkalmaztunk, mely megvalósításában Dr. Tóth Ákos (Nemzeti Agrárkutatási és Innovációs Központ) és Risa Anita (SZIE Környezetbiztonsági és Környezettoxikológiai Tanszék) nyújtottak segítséget. A vizsgálathoz kétféle extracelluláris kivonatot hoztunk létre. A DHT előinkubáció nélküli extracelluláris kivonathoz a *R. pyridinivorans* AK37 tenyészetét (45 mL LB, 5 mL inokulum) 72 órán keresztül inkubáltuk (28°C, 170 rpm), majd lecentrifugáltuk (19721,52 g, 4°C, 20 perc). A DHT-val indukált extracelluláris kivonathoz a *R. pyridinivorans* AK37 tenyészetében (45 mL LB, 5 mL inokulum) 100  $\mu$ g/L DHT koncentrációt alakítottunk ki, majd a tenyészetet 72 órán keresztül inkubáltuk (28°C, 170 rpm). Az inkubációs idő lejáta után szintén lecentrifugáltuk (19721,52 g, 4°C, 20 perc) a tenyészetet. Az SDS-PAGE módszerhez a felülúszó mintákat liofilizálással koncentráltuk. A kétféle extracelluláris kivonat fehérjeprofilját 2-2 párhuzamosban hasonlítottuk össze. Az SDS-PAGE módszernél alkalmazott 10%-os elválasztó gél, a gyűjtő gél, a futtató puffer és a 2-szeres töltő puffer összetétele a 9.4. mellékletben található. Molekulasúly markerként PageRuler Prestained Protein Ladder 170, 130, 100, 70, 55, 40, 35, 25 kDa (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) került alkalmazásra. A futtatás az elválasztó gélig 80 V feszültséggel (kb. 1,5 óra), majd a gél aljáig 130 V feszültséggel történt

(kb. 3 óra). A gél festése PAGE-Blue (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) fehérje festékkel történt, a gyártó utasítása szerint.

#### **4.2.3. A biodegradációs hatékonyság vizsgálata**

##### 4.2.3.1. A biodegradációs kísérletekből származó minták DHT tartalmának meghatározása GC-MS méréssel

A kémiai analitikai mérések a Wessling Nemzetközi Kutató és Oktató Központ Közhasznú Nonprofit Kft. (WIREC, Magyarország) laboratóriumában zajlottak. A minta-előkészítés során a felülúszó minták eredeti mintatartó edényükben 25 µg/L-es koncentrációjú deuterált epitesztoszteron (epitesztoszteron-D<sub>3</sub>) kísérőstandarddal lettek adalékolva, majd homogenizálva; míg a pelletek esetében 25 ng deuterált epitesztoszteron kísérőstandard adagolása segítette a mérést. A minták ezután 4 mL térfogatú üveg ampullákba kerültek. Mindkét mintatípus és az eredeti mintatartó centrifugacsövek extrahálása következett 2x1 mL ciklohexánnal, majd az üvegampullák és az centrifugacsövek tartalma összeöntésre került, melyet 30 másodperces homogenizálás kísért. A ciklohexános fázis 10 µg/mL koncentrációjú belső standarddal (epitesztoszteron-D<sub>3</sub>) lett kiegészítve egy újabb tartóedényben. Ezután a ciklohexános fázisok nitrogénáramú bepárlása (40°C) következett. A bepárlási maradékok származékképzése bisz(trimetilszilil)trifluoracetamiddal történt. A származékképzési reakcióhoz 5 másodperces homogenizálást követően 30 perces, 80°C-on történő szárításra (szárítószekrényben) volt szükség. A származékolt célvegyületek meghatározása GC-MS technikával történt. A módszer 100 µg/L koncentrációig lineáris az alsó meghatározási ponttól, mely a felülúszó esetében 1 µg/L, míg a pellet esetében 0,66 µg/L. A vizsgálatok a felülúszó és a pellet minták esetében is 3 párhuzamosban zajlottak, kivéve az *E. coli* TOP10-es törzs esetében, ahol a pellet mintából csak 1 mérés történt.

##### 4.2.3.2. A biodegradációs kísérletekből származó felülúszó minták biológiai hatásának elemzése

A felülúszó minták androgén és sejttoxikus hatásának vizsgálatát a 4.1.1.1 fejezetben ismertetett eljárás alapján végeztem. A vizsgálandó felülúszó mintákból 20 µL-t adagoltam a mikrotiter lemez megfelelő részeibe, 3 párhuzamosban. A vizsgálatok során pozitív kontrollként a bontási kísérletből származó kontrollokat, illetve DHT hígítási sort használtam. Negatív kontrollként 20-20 µL metanolt, ill. LB tápoldatot, valamint csak a tesztstruktúrát tartalmazó kontrollt alkalmaztam. A mintákra 180 µL beállított sejtsűrűségű (OD<sub>600</sub>= 1) BLYAS, illetve BLYR inokulumot mértem. A felülúszó minták androgén hatását biolumineszcencia

intenzifikációs értékben adtam meg, mely számítása a 2. egyenlet alapján történt (Froehner et al., 2002; Krifaton et al., 2013):

Biolumineszcencia intenzifikáció (%)=  $(-1) * (K - M) / K * 100$  (2. egyenlet)

ahol

K: a párhuzamos negatív kontrollokban mért biolumineszcencia értékek átlaga

M: a párhuzamos felülúszó mintákban mért biolumineszcencia értékek átlaga.

A felülúszó minták sejttoxikus hatását százalékos biolumineszcencia gátlási értékben adtam meg, melyhez a 2. egyenlet (-1)-szeres értéket vettem (Froehner et al., 2002).



## 5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

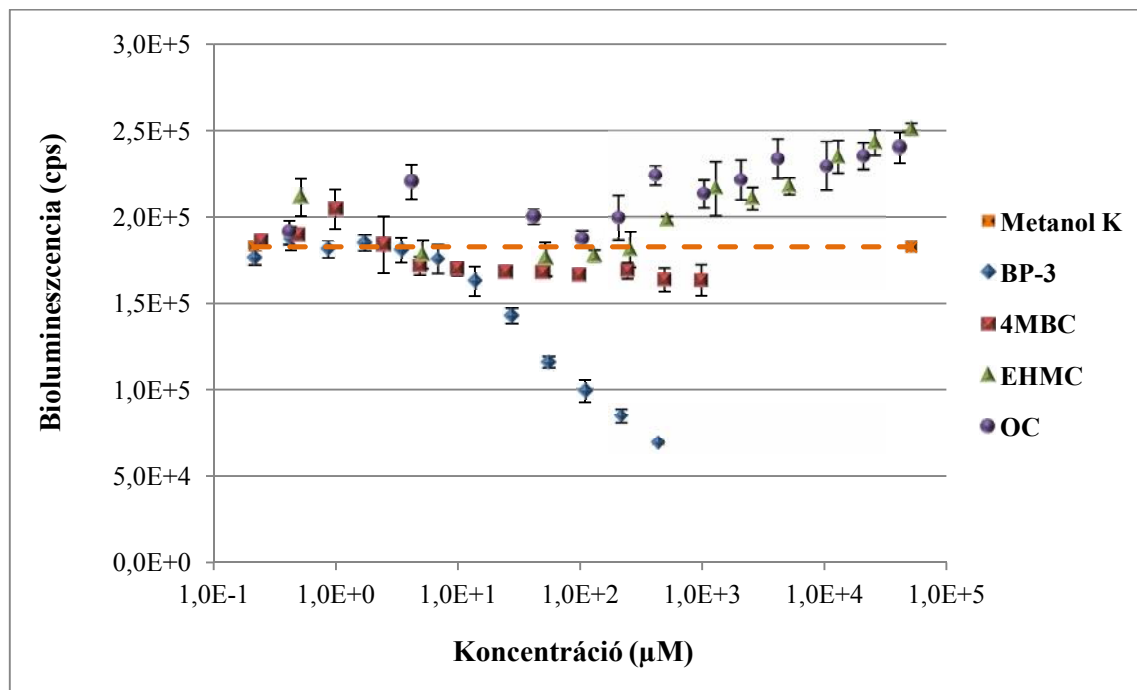
### 5.1. Az UV-szűrő vegyületek biológiai hatásmérése

Eredményeim közül először a vizsgált négy UV-szűrő (BP-3, 4MBC, EHMC és OC) esetében tapasztalt eredményeket (hormonhatás, sejttoxikus hatás) ismertetem.

#### 5.1.1. Hormonhatás és sejttoxikus hatás vizsgálata bioriporter rendszerekkel

##### 5.1.1.1. Az UV-szűrő vegyületek sejttoxikus hatása

A 4.1.1.1 fejezetben leírt és elvégzett BLYR teszt alapján a vizsgált koncentráció tartományban a tesztelt UV-szűrők közül egyedül a BP-3 rendelkezett sejttoxikus hatással (8. ábra). A 3 párhuzamos mérés átlaga alapján az  $IC_{50}$  érték  $46,7 \pm 2,66 \mu\text{M}$  ( $10,66 \pm 0,61 \text{ mg/L}$ ), a 95%-os konfidencia intervallum (CI)  $35,9\text{-}60,8 \mu\text{M}$ , az  $R^2$  érték 97,5%, míg a Hill Slope értéke -1,2 lett. A BP-3 esetében, az ösztrogén, androgén, antiösztrogén és antiandrogén tesztekben, a BLYR tesztben a legmagasabb, megfigyelhető hatást még nem okozó,  $11,2 \pm 1,20 \mu\text{M}$  ( $2,56 \pm 0,27 \text{ mg/L}$ ) koncentrációig lehet a hormonhatást egyértelműen megállapítani. Ennél magasabb koncentrációkhoz tartozó eredmények esetében a hormonhatást és a sejttoxikus hatást nem lehet elkülöníteni egymástól.



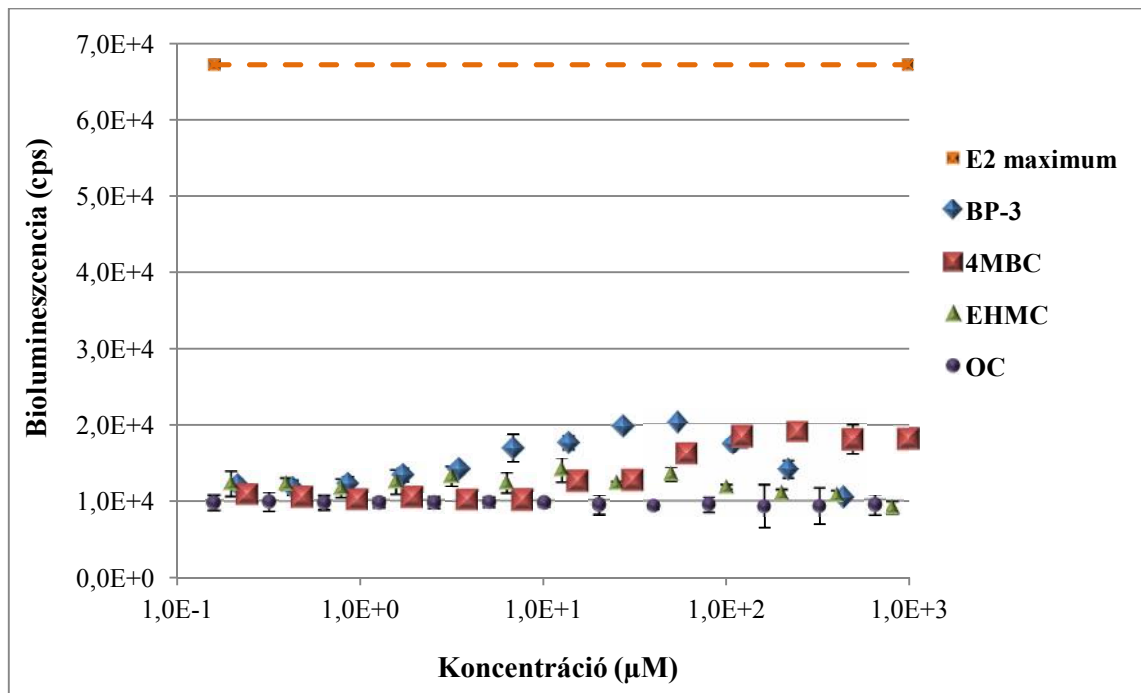
8. ábra: A 4 UV-szűrő vegyület hatása a *Saccharomyces cerevisiae* BLYR törzs fénykibocsátására, illetve a metanol és BLYR törzset tartalmazó kontroll által kiváltott biolumineszcencia érték átlaga

Kunz és Fent (2006) a BP-3 hatását vizsgálták egy rekombináns *S. cerevisiae* törzs szaporodására, azonban nem találták a vegyületet sejttoxikus hatásúnak, mivel nem tapasztaltak abszorbancia csökkenést 620 nm hullámhosszon. A *S. cerevisiae* BLYR törzs és a rekombináns *S. cerevisiae* esetében az egymásnak ellentmondó eredményt feltehetőleg az okozhatta, hogy a biolumineszcencia érzékenyebben változik az adott vegyület hatására, mint a sejtszaporodás, hiszen a biolumineszcenciáért felelős gének, illetve enzimek működésének gátlása még nem feltétlenül jár a sejt pusztulásával. A BP-3 toxikusnak bizonyult más egysejtű szervezetekre is, mint pl. a *Photobacterium phosphoreum* baktériumra (Liu et al., 2015a), az *Isochrysis galbana* algára (Paredes et al., 2014), a *Desmodesmus subspicatus* algára (Sieratowicz et al., 2011) és a *Tetrahymena thermophila* csillós egysejtűre (Gao et al., 2013). Ez utóbbi vizsgálatok az általam kapott eredményt erősítik meg, azaz igazolják a BP-3 sejttoxikus hatását.

A 4MBC, az EHMC és az OC nem volt sejttoxikus hatású sem a BLYR törzsrre, sem a Kunz és Fent (2006) által alkalmazott rekombináns *S. cerevisiae* törzsrre.

#### 5.1.1.2. Az UV-szűrő vegyületek ösztrogén hatása

A 4.1.1.1 fejezet alapján elvégzett ösztrogén hatást mérő tesztben a BP-3 esetében a vegyület sejttoxikus hatása miatt fordított U-alakú görbét kaptam (9. ábra). A sejttoxikus hatás következtében a BLYES törzssel nem lehetett a BP-3 ösztrogén hatását teljes mértékben felderíteni, így csupán NOEC értéket határoztam meg. A 4MBC esetében parciális ösztrogén hatást tapasztaltam, a koncentráció-válasz görbe szigmoid alakú volt (9. ábra). Az EHMC és az OC nem rendelkezett ösztrogén hatással.



9. ábra: A 4 UV-szűrő vegyület ösztrogén hatásának mérése a *Saccharomyces cerevisiae* BLYES törzssel, illetve a pozitív kontroll 17 $\beta$ -ösztadiol (E2) által kiváltott maximális biolumineszcencia érték átlaga

A BP-3 és a 4MBC esetében kapott NOEC értékeket és a 4MBC EC<sub>50</sub> értékét a 10. táblázat tartalmazza.

10. táblázat: A benzofenon-3 és a 4-metilbenzilidén kámfor esetében az ösztrogén tesztben kapott NOEC és EC<sub>50</sub> értékek átlaga és szórása, a 95%-os konfidencia intervallum (CI), R<sup>2</sup> és Hill Slope értékek. (n.a.= nincs adat)

Vegyület	NOEC ( $\mu$ M)	EC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	95% CI ( $\mu$ M)	R <sup>2</sup> (%)	Hill Slope
<b>Benzofenon-3</b>	1,22 $\pm$ 0,06	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
<b>4-metilbenzilidén kámfor</b>	13,2 $\pm$ 2,52	40,4 $\pm$ 1,62	30-54,4	97,8	2,2

A BP-3 ösztrogén hatását a szakirodalmi adatok is alátámasztják. Kunz és Fent (2006) rekombináns *S. cerevisiae* törzssel végzett vizsgálatában a vegyület parciális ösztrogén hatásának bizonyult, EC<sub>50</sub> értéként 18,6  $\mu$ M koncentrációt kaptak. A BP-3 ösztrogén hatású volt az MCF-7 mellráksejtvonalon is (Schlumpf et al., 2001), ahol 3,73  $\mu$ M koncentrációban növelte 50%-kal a sejtproliferációt.

Ellentétben az általam kapott eredménnyel, a 4MBC nem volt ösztrogén hatású a rekombináns *S. cerevisiae* törzssel vizsgálva (Kunz & Fent 2006) (9.5. melléklet). Schmitt és mtsai (2008) szintén rekombináns *S. cerevisiae* törzssel vizsgálták a 4MBC ösztrogén hatását, viszont Schultis és Metzger (2004) által módosított eljárás alapján, ahol a sejtfalbontó litikáz enzimet adták a tesztrendszerhez, hogy megkönnyítsék a vegyület bejutását a tesztstruktúrába. E módszer segítségével a BLYES teszthez hasonlóan parciális ösztrogén hatást mutattak ki.  $EC_{50}$  értéként 44,3  $\mu$ M koncentrációt kaptak, mely megegyezik az általam kapott értékkel. MCF-7 mellráksejtvonalon szintén ösztrogén hatásának bizonyult, 3,02  $\mu$ M koncentrációnál növelte 50%-kal a sejtproliferációt (Schlumpf et al., 2001).

Az EHMC-t és az OC-t Kunz és Fent (2006) sem találták ösztrogén hatásúnak a rekombináns élesztő tesztben (9.5. melléklet). Az általam, illetve Kunz és Fent (2006) által kapott eredményekkel ellentétben az EHMC ösztrogén hatást mutatott az MCF-7 mellráksejtvonalon ( $EC_{50}$ = 2,37  $\mu$ M) (Schlumpf et al., 2001).

#### 5.1.1.3. Az UV-szűrő vegyületek androgén hatása

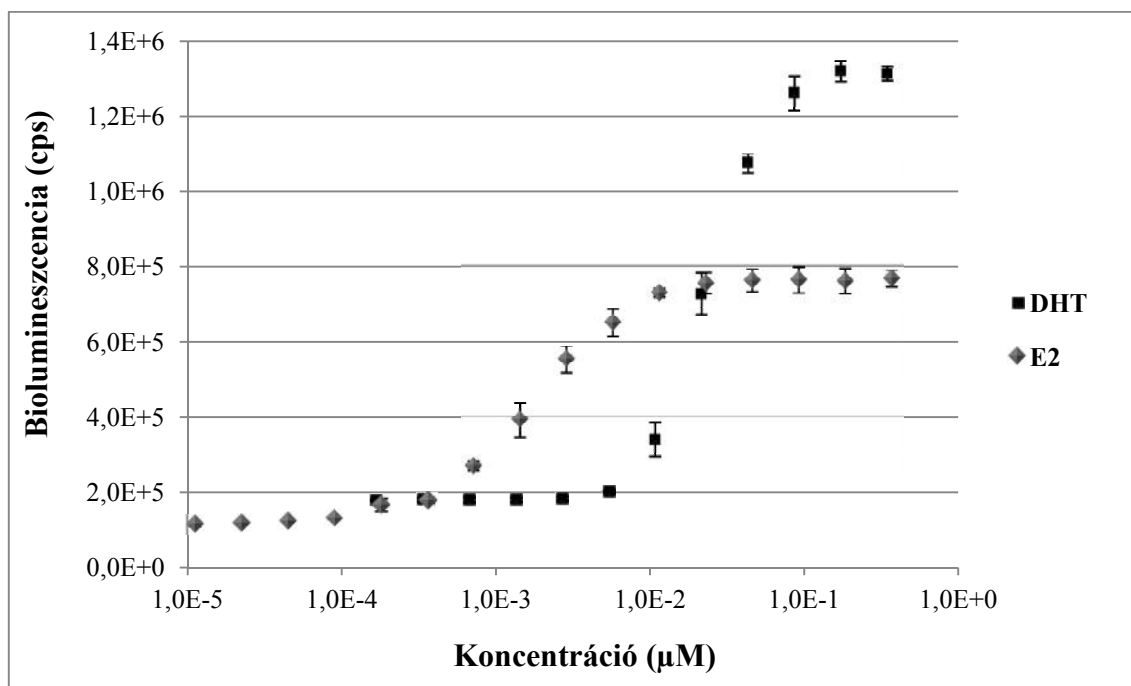
A 4.1.1.1 fejezetben bemutatott BLYAS teszt alapján egyik UV-szűrő sem bizonyult androgén hatásúnak (az eredményeket nem ábrázoltam).

Ma és mtsai (2003) a BP-3, 4MBC és EHMC androgén hatását vizsgálva nem tapasztaltak androgén hatást az MDA-kb2 humán mellráksejtvonalon. Suzuki és mtsai (2005) NIH3T3 sejtvonalon végzett vizsgálatainak alapján a BP-3 nem bizonyult androgén hatásúnak. Kunz és Fent (2006) szintén nem találta androgén hatásúnak a BP-3-at és a 4MBC-t a rekombináns élesztő tesztben, viszont az EHMC és az OC esetében parciális androgén hatást tapasztaltak (9.5. melléklet), az  $EC_{50}$  érték 10,1 mM és 0,628 mM volt. Elképzelhető, hogy a rekombináns *S. cerevisiae* esetében a hosszabb inkubációs idő lehetővé tette az EHMC és OC parciális androgén hatásának kimutatását.

#### 5.1.1.4. A *Saccharomyces cerevisiae* BLYES és BLYAS törzsek antagonistákban való alkalmazhatóságának vizsgálata

A *S. cerevisiae* BLYES, illetve BLYAS törzsekkel még nem végeztek antagonistákban való alkalmazhatóságának vizsgálatokat, ezért megvizsgáltam, hogy alkalmasak-e az antiösztrogén, illetve antiandrogén hatások mérésére. Ehhez az ismert antiösztrogén 4HT (4-hidroxitamoxifen) és ismert antiandrogén FT (flutamid) vegyületekre teszteltem a törzsek érzékenységét.

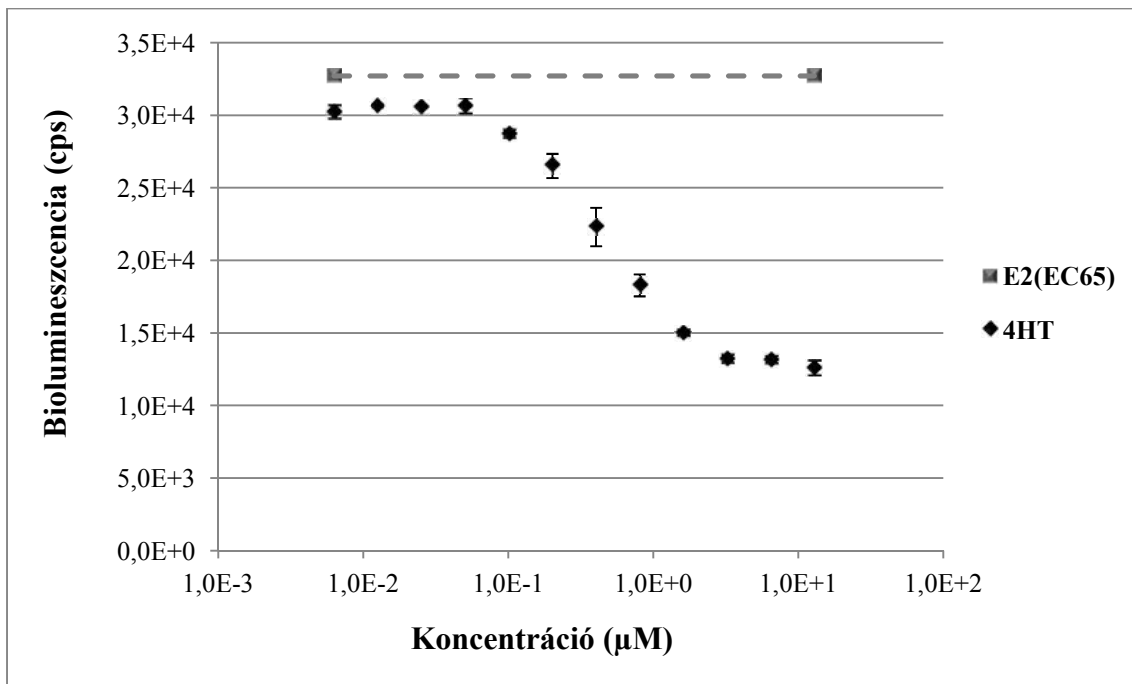
Első lépésként meghatároztam a vizsgálatához szükséges agonista vegyületek 65%-os hatást kiváltó koncentrációját a 4.1.1.1 fejezetben bemutatott és elvégzett BLYES és BLYAS tesztekben kapott szigmoid görbék alapján (10. ábra). A DHT esetében az  $EC_{65}$  érték  $30 \pm 3,31$  nM, míg az E2 esetében  $2,82 \pm 0,47$  nM lett.



**10. ábra: A *Saccharomyces cerevisiae* BLYAS és BLYES testszervezetek biolumineszcencia változása az  $5\alpha$ -dihidrotesztoszteron (DHT), illetve a  $17\beta$ -ösztradiol (E2) hatására**

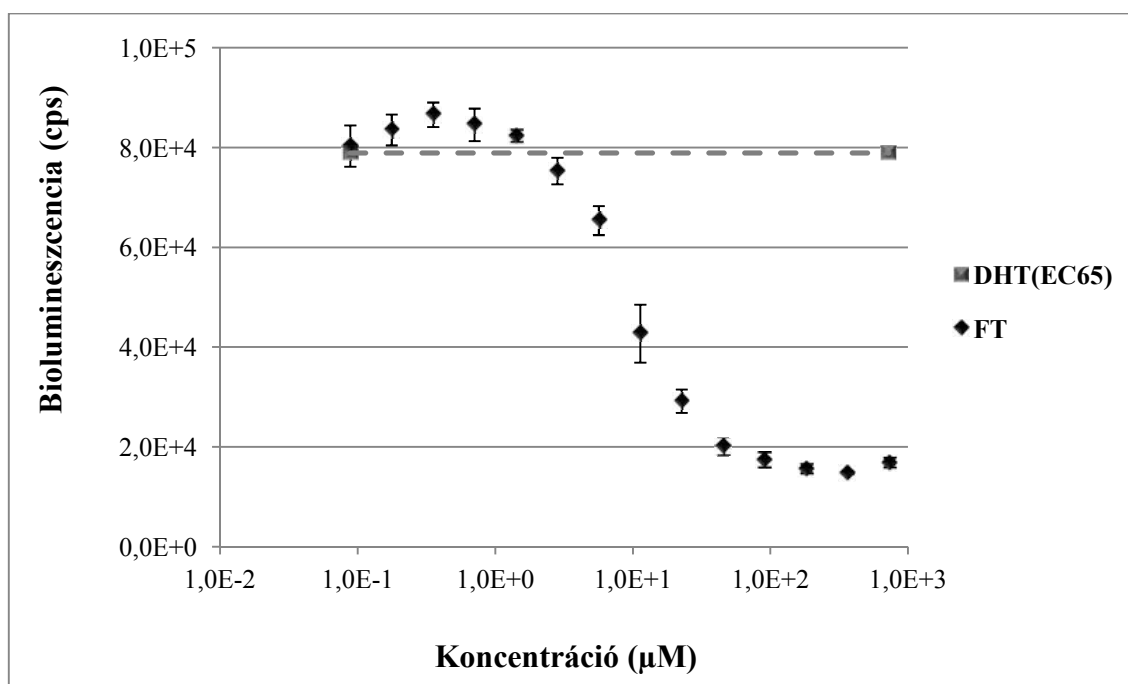
Az antagonisták tesztjei előtt ellenőriztem a 4HT és FT hatását a sejttöxikus hatást mérő *S. cerevisiae* BLYR törzsre (4.1.1.1 fejezet). Egyik vegyület sem volt sejttöxikus hatású a vizsgált koncentráció tartományban (az eredményeket nem ábrázoltam).

A 11. ábrán a 4HT koncentráció-válasz görbéje látható a 4.1.1.2 fejezet alapján elvégzett antiösztrogén tesztben. A NOEC és  $IC_{50}$  értékeket a 11. táblázat tartalmazza.



**11. ábra: A *Saccharomyces cerevisiae* BLYES törzs érzékenysége a 4-hidroxitamoxifen (4HT) vegyületre az antiösztrogén tesztben, illetve a 17β-ösztradiol (E2) 65%-os hatásos koncentrációja (EC<sub>65</sub>) által kiváltott átlagos biolumineszcencia**

A FT esetében – a 4HT-hez hasonlóan – fordított szigmoid alakú koncentráció-válasz görbét kaptam (12. ábra). A BLYAS tesztben (4.1.1.2 fejezet) a FT antiandrogén hatásának bizonyult (11. táblázat).



12. ábra: A *Saccharomyces cerevisiae* BLYAS törzs érzékenysége a flutamid (FT) vegyületre az antiandrogén tesztben, illetve az 5 $\alpha$ -dihidrotesztoszteron (DHT) 65%-os hatásos koncentrációja (EC<sub>65</sub>) által kiváltott átlagos biolumineszcencia

11. táblázat: A 4-hidroxitamoxifen és a flutamid esetében az antiösztrogén, illetve az antiandrogén tesztekben kapott NOEC és IC<sub>50</sub> értékek átlaga és szórása, a 95%-os konfidencia intervallum (CI), az R<sup>2</sup> és Hill Slope értéke

Vegyület	NOEC (μM)	IC <sub>50</sub> (μM)	95% CI (μM)	R <sup>2</sup> (%)	Hill Slope
4-hidroxitamoxifen	0,14 ± 0,04	0,47 ± 0,08	0,42-0,51	99,3	-1,47
Flutamid	2,11 ± 0,39	9,45 ± 1,03	8,41-10,47	98,9	-1,74

Kunz és Fent (2006) rekombináns élesztő tesztorganizmussal végzett vizsgálatában a 4HT IC<sub>50</sub> értékére 0,49 ± 0,21 μM, míg a FT IC<sub>50</sub> értékére 4,32 ± 1,81 μM koncentrációt kaptak, mely értékek nagyságrendileg megegyeznek az általam kapott értékekkel (11. táblázat).

Az eredmények alapján megállapítható, hogy mind a BLYES, mind a BLYAS törzs alkalmas antagonisták tesztelésében való alkalmazásra, mint tesztorganizmus.

#### 5.1.1.5. Az UV-szűrő vegyületek antiösztrogén hatása

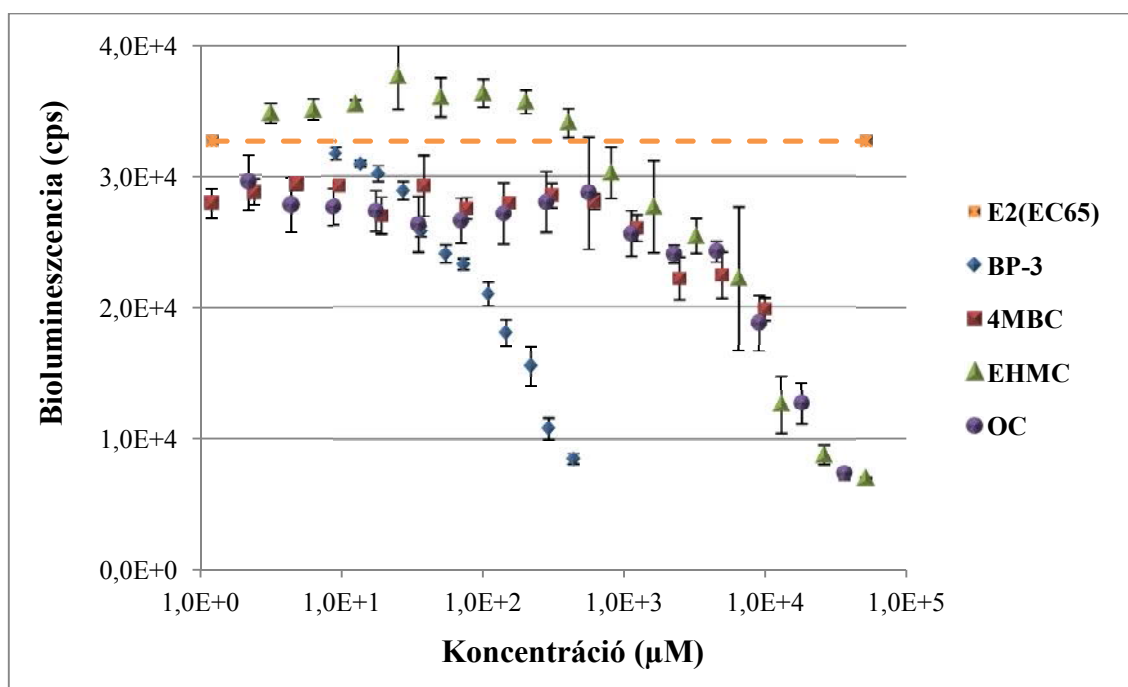
A BP-3 esetében, a 4.1.1.2 fejezetben leírt és elvégzett antiösztrogén tesztben habár tapasztaltam biolumineszcencia gátlást (13. ábra), az csupán abban a koncentráció tartományban következett be, ahol a BLYR törzs már sejttoxikus hatást jelzett, így a vegyület antiösztrogén

hatását nem lehetett megállapítani (9.5. melléklet). Eredményemmel ellentétben Kunz és Fent (2006) a BP-3-at találta a legerősebb antiösztrogén hatású vegyületnek a vizsgált UV-szűrők közül.

A 4MBC antiösztrogén hatást mutatott (13. ábra), azonban a koncentráció-válasz görbe nem teljes, mivel 98,3 mM koncentrációnál magasabb koncentrációjú törzsoldatot már nem lehetett készíteni metanolban. A tapasztalt antiösztrogén hatás nem tekinthető jelentősnek, mivel a pozitív kontroll 4HT NOEC értékéhez képest ( $0,14 \pm 0,04 \mu\text{M}$ ) a 4MBC antiösztrogén hatása 4 nagyságrenddel magasabb koncentrációnál jelentkezett. E vizsgálat eredményeivel ellentétben Kunz és Fent (2006) rekombináns élesztővel vizsgálva, az antiösztrogén tesztben teljes koncentráció-válasz görbét kapott a 4MBC esetében ( $\text{IC}_{50} = 87,3 \mu\text{M}$ ) (9.5. melléklet). A BLYES törzsszel és a rekombináns *S. cerevisiae* törzsszel kapott eredmények közötti különbség feltehetőleg az eltérő inkubációs időből adódott. A BLYES törzs esetében az inkubációs idő 5 óra (Sanseverino et al., 2005), míg a rekombináns *S. cerevisiae* törzs esetében 72 óra volt (Sohoni és Sumpter, 1998).

Az EHMC és OC esetében teljes koncentráció-válasz görbét kaptam az antiösztrogén tesztben (13. ábra). A NOEC és  $\text{IC}_{50}$  értékeket az 12. táblázat tartalmazza. A teszt eredménye alapján az EHMC és OC nem rendelkezik jelentős antiösztrogén hatással a 4HT NOEC és  $\text{IC}_{50}$  értékeihez képest (11. táblázat). Kunz és Fent (2006) vizsgálataikban szintén teljes koncentráció-válasz görbét kaptak az EHMC és OC esetében (9.5. melléklet). Az EHMC  $\text{IC}_{50}$  értéke (4,3 mM) nagyságrendileg megegyezett a BLYES tesztben kapott értékkel, míg az OC esetében az  $\text{IC}_{50}$  érték (2,57 mM) egy nagyságrenddel alacsonyabb volt, mint a BLYES tesztben (12. táblázat).





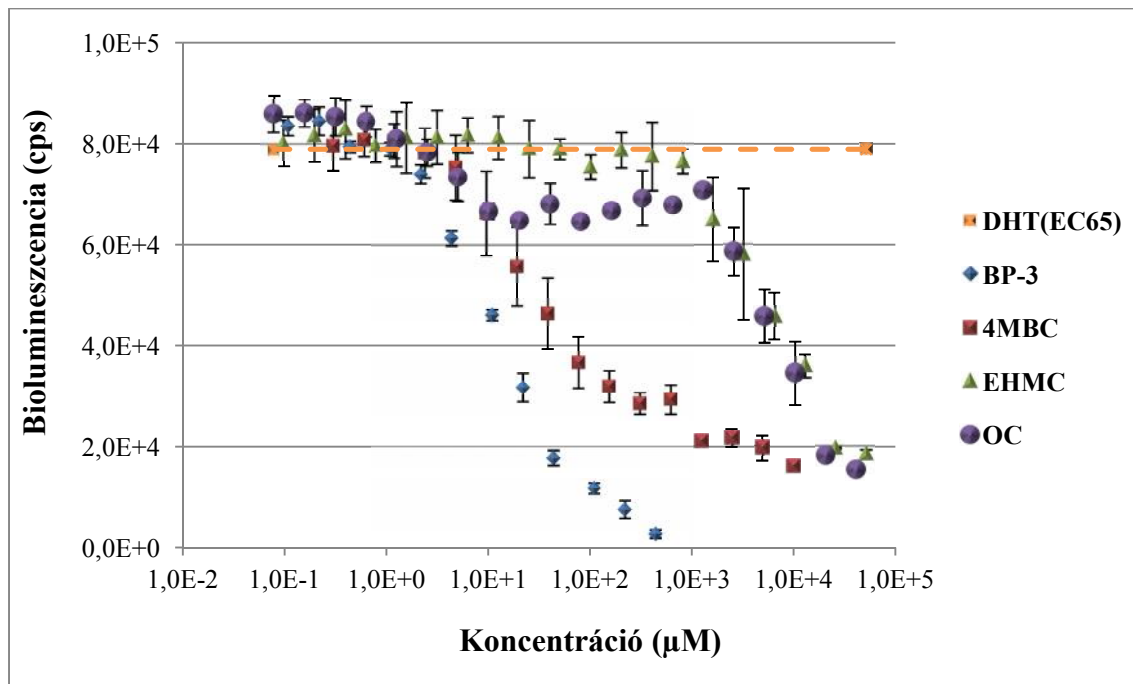
13. ábra: A 4 UV-szűrő vegyület antiösztrogén hatása a *Saccharomyces cerevisiae* BLYES törzssel vizsgálva, illetve a 17 $\beta$ -ösztradiol (E2) 65%-os hatásos koncentrációja (EC<sub>65</sub>) által kiváltott átlagos biolumineszcencia

12. táblázat: Az etilhexil-metoxicinnamát és az oktokrilén antiösztrogén tesztben kapott NOEC és IC<sub>50</sub> értékei átlaggal és szórással, illetve a 95%-os konfidencia intervallum (CI), R<sup>2</sup> és Hill Slope értékek

Vegyület	NOEC (µM)	IC <sub>50</sub> (µM)	95% CI (µM)	R <sup>2</sup> (%)	Hill Slope
Etilhexil-metoxicinnamát	709 ± 33,3	4700 ± 406	3166-7184	97,5	-1,01
Oktokrilén	4030 ± 2950	15300 ± 4780	5210-66880	97,5	-1,19

#### 5.1.1.6. Az UV-szűrő vegyületek antiandrogén hatása

A 14. ábra a vizsgált UV-szűrő vegyületek antiandrogén hatását mutatja be a BLYAS törzssel végzett vizsgálatban (4.1.1.2 fejezet). A 14. ábra alapján mind a 4 UV-szűrő teljes koncentráció-válasz görbét mutatott, az OC esetében ráadásul a hatás nem-monoton görbével írható le.



14. ábra: A 4 UV-szűrő vegyület antiandrogén hatása a *Saccharomyces cerevisiae* BLYAS törzssel vizsgálva, illetve az 5 $\alpha$ -dihidrotesztoszteron (DHT) 65%-os hatásos koncentrációja (EC<sub>65</sub>) által kiváltott átlagos biolumineszcencia

A BP-3 habár mutatott antiandrogén hatást, a szigmoid görbe egy része már a BLYR törzs által sejttoxikusnak jelzett tartományba esett, így csupán NOEC értéket (1,82  $\mu$ M) határoztam meg (13. táblázat). Ez az érték a pozitív kontroll FT esetében kapott NOEC értékkel (2,11  $\pm$  0,39  $\mu$ M) nagyságrendileg megegyezett. A BP-3 antiandrogén hatását szakirodalmi *in vitro* adatok is alátámasztják, mivel a BP-3 antiandrogén hatásának bizonyult rekombináns élesztő tesztorganizmummal (Kunz & Fent 2006) (9.5. melléklet), HEK 293 sejtvonalon (Nashev et al., 2010) és U2-OS sejtvonalon (Schreurs et al., 2005) vizsgálva.

A 4MBC szintén jelentős antiandrogén hatással jellemezhető a BLYAS teszt alapján (13. táblázat). Ezt a vegyületet Kunz és Fent (2006) is antiandrogén hatásúnak találta (IC<sub>50</sub>= 11,8  $\mu$ M) a rekombináns élesztő tesztben (9.5. melléklet), ellenben Ma és mtsai (2003) az MDA-kb2 sejtvonalon nem mutattak ki antiandrogén hatást.

Az EHMC bár mutatott antiandrogén hatást (13. táblázat), az IC<sub>50</sub> értéke 3 nagyságrenddel magasabb volt, mint a FT IC<sub>50</sub> értéke (11. táblázat). Hasonlóan, mint a 4MBC esetében, kevés és egymásnak ellentmondó *in vitro* vizsgálat eredménye áll rendelkezésre a szakirodalomban az EHMC antiandrogén hatásával kapcsolatban. Kunz és Fent (2006) az EHMC-t antiandrogén hatásúnak találta a rekombináns élesztő tesztben (IC<sub>50</sub>= 312  $\mu$ M) (9.5. melléklet), viszont MDA-kb2 sejtvonalon vizsgálva nem volt antiandrogén hatású a vegyület (Ma et al., 2003).

Az antiandrogén tesztben az OC NOEC értéke egy nagyságrenddel alacsonyabb volt, mint a FT NOEC értéke, azonban az OC IC<sub>50</sub> értéke 3 nagyságrenddel magasabb volt, mint a FT IC<sub>50</sub> értéke (11. táblázat és 13. táblázat). A nem-monoton koncentráció-válasz görbével leírható hatás nem ritka jelenség az ED vegyületek esetében (Cookman & Belcher, 2014; Vandenberg et al., 2012). Collins és mtsai (1997) a chrysin antiösztrogén hatásának mérése során hasonló lefutású görbét kaptak, mint az OC esetében kapott görbe (14. ábra). A nem-monoton görbe lehetséges magyarázata, hogy az OC az alacsony koncentráció tartományban a receptor másodlagos kötőhelyéhez kapcsolódik, majd a magasabb koncentráció tartományban kompetíció lép fel az OC és a DHT között az elsődleges kötőhelyért (Collins et al., 1997).

Kunz és Fent (2006) is antiandrogén hatásúnak találta az OC-t (IC<sub>50</sub>= 24,5 µM) a rekombináns élesztő tesztben (9.5. melléklet), azonban nem vizsgálták a hatást a magasabb koncentráció tartományokban, ahol a BLYAS törzs szintén antiandrogén hatást jelzett.

13. táblázat: A 4 UV-szűrő vegyület antiandrogén tesztben kapott NOEC és IC<sub>50</sub> értékei átlaggal és szórással, illetve a 95%-os konfidencia intervallum (CI), R<sup>2</sup> és Hill Slope értékek (n.a.= nincs adat)

Vegyület	NOEC (µM)	IC <sub>50</sub> (µM)	95% CI (µM)	R <sup>2</sup> (%)	Hill Slope
<b>Benzofenon-3</b>	1,82 ± 0,18	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
<b>4-metilbenzilidén kámfor</b>	4,27 ± 2,24	30,4 ± 14,8	21,25-38,92	99,2	-0,89
<b>Etilhexil-metoxicinnamát</b>	1080 ± 531	6830 ± 2450	4811-10088	99,2	-1,026
<b>Oktokrilén</b>	0,44 ± 0,2	7340 ± 2410	5598-9506	99,0	-1,831

#### 5.1.1.7. Új tudományos eredmények (az 5.1.1 fejezet alapján)

**1. tézis:** A *Saccharomyces cerevisiae* BLYR törzssel sejtoxikus hatást mutattam ki a benzofenon-3 esetében. A vegyület a tesztstruktúra biolumineszcenciáját  $46,7 \pm 2,66$  µM koncentrációnál csökkentette 50%-kal.

**2. tézis:** A *Saccharomyces cerevisiae* BLYES törzs litikáz enzim hozzáadása nélkül is képes a 4-metilbenzilidén kámfor parciális ösztrogén hatásának kimutatására, ellenben a *Saccharomyces cerevisiae* rekombináns törzsével (Genetics Department, Glaxo Wellcome plc, Nagy-Britannia).

**3. tézis:** A *Saccharomyces cerevisiae* BLYES és BLYAS törzsek alkalmasak antiösztrogén és antiandrogén hatások mérésére. A benzofenon-3 esetében antiandrogén, míg a 4-

metilbenzilidén kámfor, az etilhexil-metoxicinnamát és az oktokrilén esetében antiösztrogén, illetve antiandrogén hatás mutatható ki. A *S. cerevisiae* BLYAS törzssel az oktokrilén antiandrogén hatása nem-monoton koncentráció-válasz görbével írható le.

Az 1., 2. és 3. tézisbe foglalt eredmények a következő publikációban jelentek meg:

Balázs, A., Krifaton, Cs., Orosz, I., Szoboszlai, S., Kovács, R., Csenki, Zs., Urbányi, B., Kriszt, B. (2016): Hormonal activity, cytotoxicity and developmental toxicity of UV filters. *Ecotoxicology & Environmental Safety* 131: 45–53. (IF: 3,974; Q1)

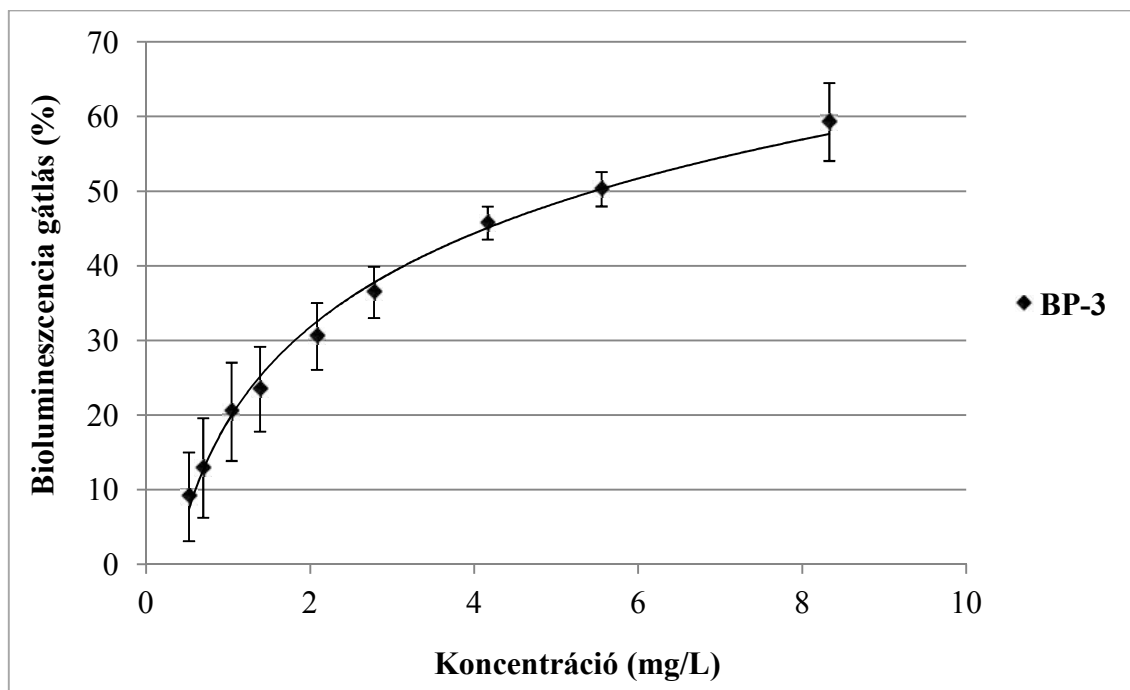
### **5.1.2. Toxikus hatás vizsgálata vízi tesztszervezeteken**

A következő alfejezetekben a BP-3-mal végzett vízi ökotoxikológiai tesztek eredményei kerülnek bemutatásra.

#### **5.1.2.1. *Aliivibrio fischeri* biolumineszcencia gátlási teszt**

A teszt – melyet a 4.1.2.1 fejezetben leírtak alapján végeztem el – érvényességi kritériumai teljesültek, az  $fk$  értékek a megadott értéktartományon belülre estek. A szórás értékek a kontrollban és az egyes mérési pontokban nem haladták meg a 3%-os határt, kivéve az egyik ismétlés esetében a kontrollban, és az 1:2 hígítási szinten, továbbá egy másik ismétlés esetében az 1:16 hígítási szinten, ahol minimális szórástúllépést tapasztaltam.

A BP-3 hatását 8,33-0,52 mg/L (36,5-2,28  $\mu$ M ) koncentrációk között vizsgáltam az *A. fischeri* baktérium fénykibocsátására (15. ábra). A BP-3 1,16  $\pm$  0,51 mg/L (5,09  $\pm$  2,25  $\mu$ M) koncentrációban 20%-kal, míg 5,55  $\pm$  0,97 mg/L (24,3  $\pm$  4,24  $\mu$ M) koncentrációban 50%-kal gátolta az *A. fischeri* fénykibocsátását.



15. ábra: A benzofenon-3 hatása az *Aliivibrio fischeri* fénykibocsátására

A BP-3 tengeri baktériumokra kifejtett toxikus hatását eddig kevesen vizsgálták. Zhuang és mtsai (2013) szintén *A. fischeri* baktériummal tesztelték a BP-3 toxicitását. A 30 perces kontaktidőt követően IC<sub>20</sub> értéként 33,32 mg/L (146 µM), míg IC<sub>50</sub> értéként 151,1 mg/L (662 µM) koncentrációt kaptak. Zhang és mtsainak (2017) vizsgálata is megerősítette, hogy a BP-3 toxikus az *A. fischeri* baktériumra. IC<sub>50</sub> értéként 13,4 mg/L (58,7 µM) koncentrációt kaptak 15 perces kontaktidőt követően. Liu és mtsai (2015a) különböző BP-típusú vegyületek hatását tesztelték az *A. fischeri* baktériumhoz hasonlóan tengeri, lumineszcens *Photobacterium phosphoreum* baktériumon. A BP-3 esetében az IC<sub>50</sub> érték 14,27 mg/L (62,5 µM) lett 15 perc inkubációs idő elteltével.

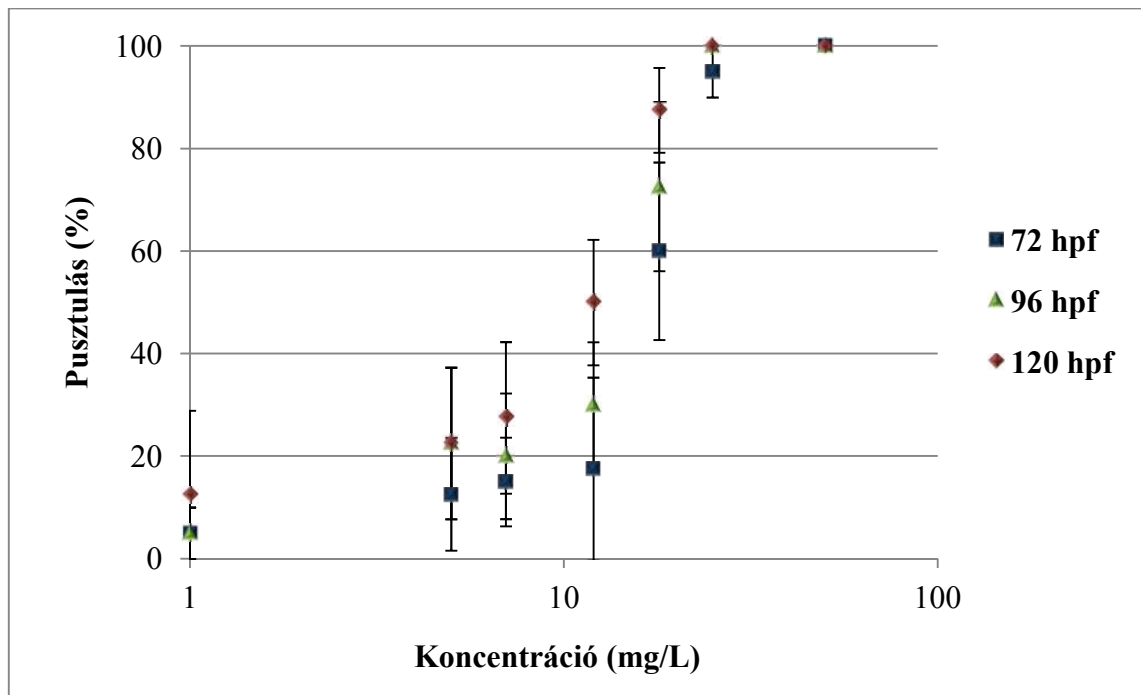
Vizsgálatomban az IC<sub>50</sub> érték jelentősen alacsonyabb volt, mint Zhang és mtsai (2017), illetve Zhuang és mtsai (2013) kísérletében. A különbség egyrészt adódhatott az eltérő inkubációs idő, másrészt a különböző mennyiségű oldószer alkalmazásából. Kísérletemben a DMSO végkoncentrációja 1,65 V/V % volt, míg Zhuang és mtsai (2013) acetont és DMSO keverékében oldották a BP-3-at, ahol az oldószerkeverék végkoncentrációja 0,01 V/V % volt. Zhang és mtsai (2017) szintén DMSO-t használtak oldószerként, melynek koncentrációja 1 V/V % alatt volt. A nagyobb mennyiségű oldószer alkalmazása növelhetette a BP-3 biológiai hozzáférhetőségét az *A. fischeri* számára, így alacsonyabb IC<sub>50</sub> értéket eredményezhetett.

### 5.1.2.2. Zebradánió (*Danio rerio*) embrió teszt (OECD 236)

A zebradánió embrió teszthez a vizsgálni kívánt BP-3 koncentrációkat előkísérlet alapján határoztam meg úgy, hogy a legmagasabb koncentrációnál 100%, míg a legalacsonyabb koncentrációnál 10% alatt legyen a kumulatív mortalitás. Az előkísérlet alapján kiválasztott koncentrációk a következők voltak: 25 mg/L (110  $\mu$ M), 18 mg/L (78,9  $\mu$ M), 12 mg/L (52,6  $\mu$ M), 7 mg/L (30,7  $\mu$ M), 5 mg/L (21,9  $\mu$ M) és 1 mg/L (4,38  $\mu$ M).

A teszt – melyet a 4.1.2.2 fejezetben leírtak alapján végeztem el – érvényességi kritériumai teljesültek, mivel a kumulatív mortalitás a negatív és az oldószeres kontrollban 10% alatt volt, míg a pozitív kontrollban 75% volt a teszt végén. A kelési siker mind a negatív, mind az oldószeres kontrollban 95-95% volt, míg a pozitív kontroll esetében egyik ikra sem kelt ki. A negatív kontrollban nem fordult elő egyik embriónál sem fejlődési rendellenesség a teszt során, illetve az oldószeres kontrollban sem, egy embriót kivéve, melynél nem töltődött fel az úszóhólyag. A rendszervíz hőmérséklete és oldott oxigén tartalma is megfelelt az előírt feltételeknek. Mivel az oldószeres kontroll esetében kapott eredmények megfeleltek az érvényességi kritériumoknak, így az előírt 100  $\mu$ L/L maximális oldószer koncentráció túllépése (250  $\mu$ L/L DMSO) nem befolyásolta a vizsgálat eredményeit.

A BP-3 koncentráció-függő módon növelte az elpusztult zebradánió embriók számát (16. ábra). A megtermékenyítést követő 72., 96. és 120. órában a következő  $LC_{50}$  értékeket kaptam:  $17,6 \pm 0,36$  mg/L ( $77,3 \pm 1,56$   $\mu$ M),  $16 \pm 0,74$  mg/L ( $70,2 \pm 3,23$   $\mu$ M) és  $12,14 \pm 0,98$  mg/L ( $53,2 \pm 4,29$   $\mu$ M). Az  $LC_{50}$  értékek az idő előrehaladtával csökkenő tendenciát mutattak (14. táblázat).

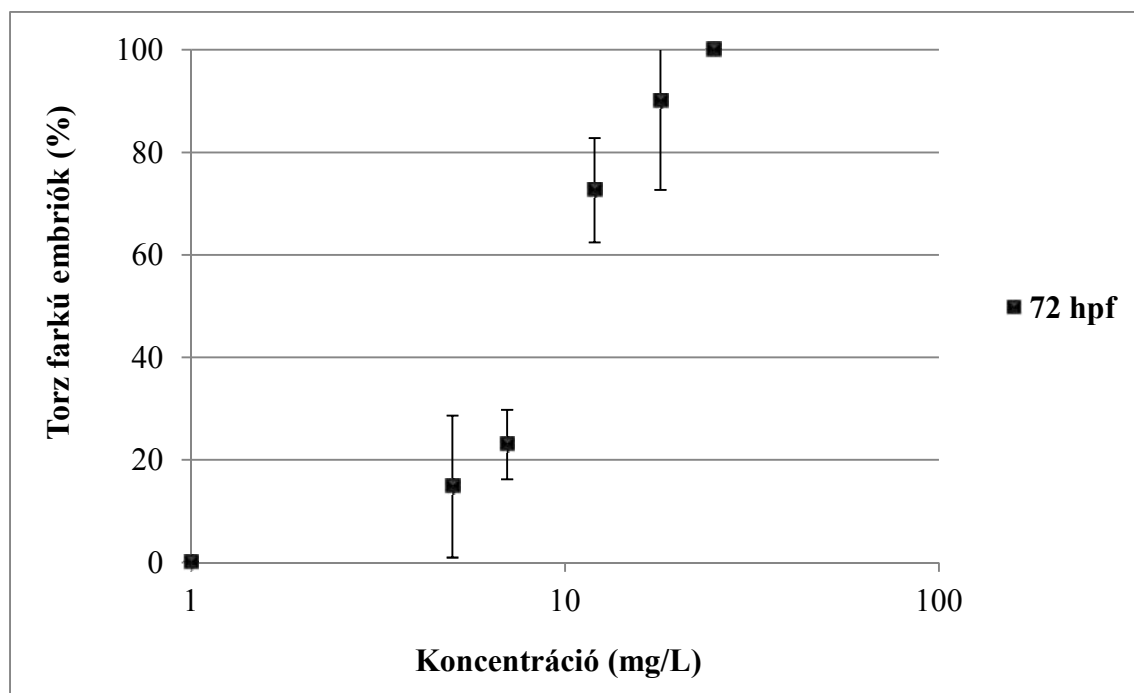


**16. ábra: A benzofenon-3 hatására elpusztult zebradánió embriók százalékos aránya a megtermékenyítést követő 72., 96. és 120. órában**

Du és mtsai (2017) 96 órás zebradánió akut tesztben 3,89 mg/L (17  $\mu$ M) koncentrációt kaptak  $LC_{50}$  értéként. Blüthgen és mtsai (2012) felnőtt és embrió zebradánió vizsgálták a BP-3 toxicitását, viszont alacsonyabb koncentráció tartományban (600-10  $\mu$ g/L; 2,63-0,044  $\mu$ M), mint az általam, illetve Du és mtsai (2017) által végzett vizsgálatban. Az embriók 120 óráig, míg a felnőtt halak 14 napig voltak kitéve a BP-3-nak. A tesztek végén egyik esetben sem tapasztaltak pusztulást, az embriók úszó mozgásában nem volt megfigyelhető rendellenesség, viszont a BP-3 mind a felnőtt, mind az embrió zebradániók hormonrendszeréhez kapcsolódó gének átíródását befolyásolta. Felnőtt japán medaka esetében a BP-3 96 órás vizsgálatban szintén pusztulást okozott, az  $LC_{50}$  érték 3,79 mg/L (16,6  $\mu$ M) volt (http21). A 96 órás zebradánió (Du et al., 2017) és japán medaka (http21) akut tesztekben a BP-3 esetében kapott  $LC_{50}$  értékek megegyeztek, tehát a két faj felnőtt egyedei azonos érzékenységgel rendelkeztek a pusztulás tekintetében. Zebradánió embriókkal végzett vizsgálatomban azonban a 96. órában kapott  $LC_{50}$  érték magasabbnak bizonyult, mint a felnőtt zebradánió és a japán medaka esetében kapott értékek (Du et al., 2017; http21). A pusztulás tekintetében tehát a zebradánió embriók kevésbé voltak érzékenyek, mint a felnőtt zebradániók. Az eltérés adódhat az életszakaszok közötti érzékenységbeli különbségből, illetve az ikrahéj akadályozhatta a vegyület embrió általi felvételét (Henn & Braunbeck 2011).

Irodalmi adatok alapján a BP-3 maximális környezeti koncentrációja 3,3 µg/L (tengervíz) (Tarazona et al., 2010). Eredményeim, illetve a szakirodalom alapján (Blüthgen et al., 2012; Du et al., 2017; http21) a BP-3 a környezetben eddig ismert legmagasabb koncentrációjánál magasabb koncentrációkban letális zebraadánióra és japán medakára.

Vizsgálatomban a BP-3 expozíció a zebraadánió embriók farki részének torz fejlődését eredményezte (17. ábra; 2. kép D-F). A torz farkú embriók száma a koncentráció függvényében növekedett ( $EC_{50} = 10,16 \pm 1,51$  mg/L;  $44,5 \pm 6,6$  µM) (14. táblázat).

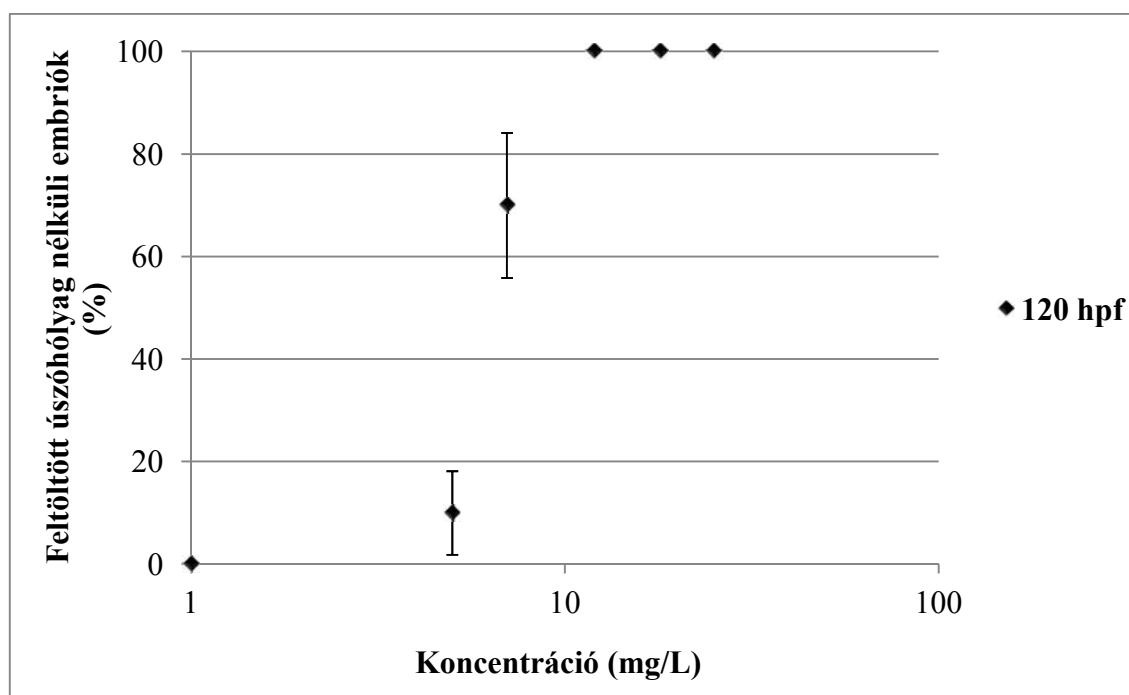


17. ábra: A benzofenon-3 hatása a zebraadánió embriók farki részének fejlődésére a megtermékenyítést követő 72. órában

Incardona és mtsai (2004) vizsgálatában az aromás gyűrűs fluorén, fenantrén és dibenzotiofén szintén a farki rész torzulását okozta zebraadánió embrióknál. Mindemellett a dibenzotiofén és a fenantrén perikardiális- és sziködémát, továbbá szívproblémákat is okozott, mely a háti és farki rész görbületét eredményezheti. A nem megfelelő keringés károsan befolyásolhatja a vese fejlődését az embriókban, mely szintén okozhat sziködémát (Incardona et al., 2004). Kísérletem során több embriónál is tapasztaltam sziködémát (2. kép F) és perikardiális ödémát (2. kép E), melyek lehetséges, hogy hozzájárultak a torz farokrész kialakulásához. A farki rész deformációjához vezethet még a farki részben bekövetkező apoptózis, illetve az izomrostok elváltozása is (Huang et al., 2010).



A BP-3 koncentráció-függő módon gátolta az úszóhólyag feltöltődését (18. ábra; 2. kép C-F), az IC<sub>50</sub> érték  $7,28 \pm 0,52$  mg/L ( $31,9 \pm 2,28$  μM) volt (14. táblázat).



18. ábra: A benzofenon-3 hatása a zebradánió embriók úszóhólyag feltöltésére a megtermékenyítést követő 120. órában

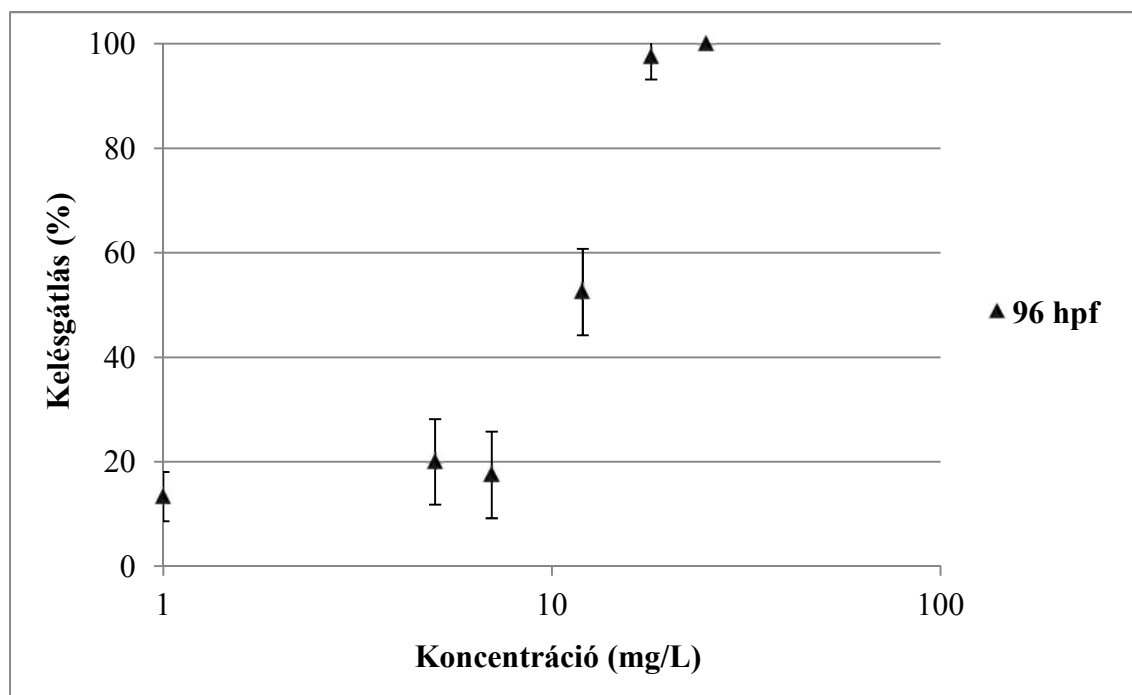
Az úszóhólyagnak jelentős szerepe van a halak úszásában, így a feltöltődés hiánya akadályozza a táplálékszerzésben, a ragadozók elől való elmenekülésben és a szaporodásban is (Gee 1983), mely tényezők gátlása a hal pusztulásához vezethet.

A szakirodalom szerint az aromás gyűrűvel rendelkező molekulák – mint például a BP-3 is – akadályozhatják az úszóhólyag feltöltését (Incardona et al., 2004). Hagenars és mtsai (2011) perfluor-tartalmú vegyületek hatását vizsgálva szintén az úszóhólyag feltöltődésének hiányát és rendellenes úszómozgást tapasztaltak zebradánió embrióknál.

Az úszóhólyag feltöltéséhez fontos, hogy a hal képes legyen felúszni a víz-levegő határfelülethez, és hogy levegőt tudjon juttatni az úszóhólyagjába. A torz farki rész akadályozza a halat az úszásban, így ez a tényező is hozzájárulhat az úszóhólyag feltöltésének hiányához (Lindsey et al., 2010).

Az úszóhólyag feltöltésében az úszóhólyag gázmirigy sejtjei által termelt felületaktív vegyület is szerepet játszik, így a felületaktív vegyület bioszintézisének gátlása hozzájárulhat a feltöltődés elmaradásához (Prem et al., 2000).

A BP-3 koncentráció-függő módon gátolta a zebradánió embriók kelését (19. ábra), az  $IC_{50}$  érték  $11,94 \pm 0,27$  mg/L ( $52,3 \pm 1,20$   $\mu$ M) volt (14. táblázat).



19. ábra: A benzofenon-3 hatása a zebradánió embriók kelési sikerére a megtermékenyítést követő 96. órában

A sikeres keléshez elengedhetetlen, hogy rendelkezésre álljanak a kelési enzimek, illetve hogy az embrió képes legyen összehúzó mozgást végezni. A zebradániók genomján a zebradánió kelési enzim 1-et és 2-t (ZHE1 és ZHE2) kódoló gének találhatók meg. A két enzim közül az embriók kelését a ZHE1 teszi lehetővé az ikrahéj elemésztésével (a ZHE2 az evolúció során elvesztette funkcióját) (Sano et al., 2008). Elképzelhető, hogy a BP-3 a ZHE1, illetve az azt kódoló gén működésének gátlásával csökkentette a zebradánió embriók kelési sikerét. Vizsgálatomban a BP-3 a zebradánió embriók farki részének torzulását okozta (17. ábra), így lehetséges, hogy az akadályozott mozgás is hozzájárult az alacsonyabb kelési százalékhöz. A BP-3 a japán medaka kelési sikerét is szignifikánsan csökkentette, 0,62 mg/L (2,72  $\mu$ M) koncentrációban. A vizsgálatban az ivarérett halakat 21 napon keresztül exponálták BP-3-mal, majd feljegyezték a létrehozott embriók kelési sikerét (Coronado et al., 2008). A BP-3 nemcsak

halaknál, hanem rovaroknál is képes gátolni a kelést, pl. az árvaszúnyog lárvák kelését szignifikánsan késleltette 0,91 mg/L (4 µM) koncentrációban, 72 óra expozíció során (Ozáez et al., 2014).

A 14. táblázat a zebradánió embrió tesztben számított 50%-os letális, gátlási és hatásos koncentrációkat foglalja össze. A letalitást okozó (120 hpf) és a kelési sikert befolyásoló koncentrációk csak kis mértékben térnek el a torz farki fejlődést eredményező koncentrációtól, így elképzelhető, hogy a kelési siker a torz farki rész miatt csökkent és a két tényező együttesen az embriók pusztulásához vezetett.

**14. táblázat: A zebradánió (*Danio rerio*) embrió tesztben számított 50%-os letális (LC<sub>50</sub>), gátlási (IC<sub>50</sub>), illetve hatásos (EC<sub>50</sub>) koncentrációk a szórás értékekkel.**

Hatás	Letális hatás			Torz farki rész	Kelésgátlás	Úszóhólyag feltöltődés gátlás
Idő (hpf)	72	96	120	72	96	120
LC <sub>50</sub> /IC <sub>50</sub> /EC <sub>50</sub> (mg/L)	17,6	16	12,14	10,16	11,94	7,28
Szórás	0,36	0,74	0,98	1,51	0,27	0,52

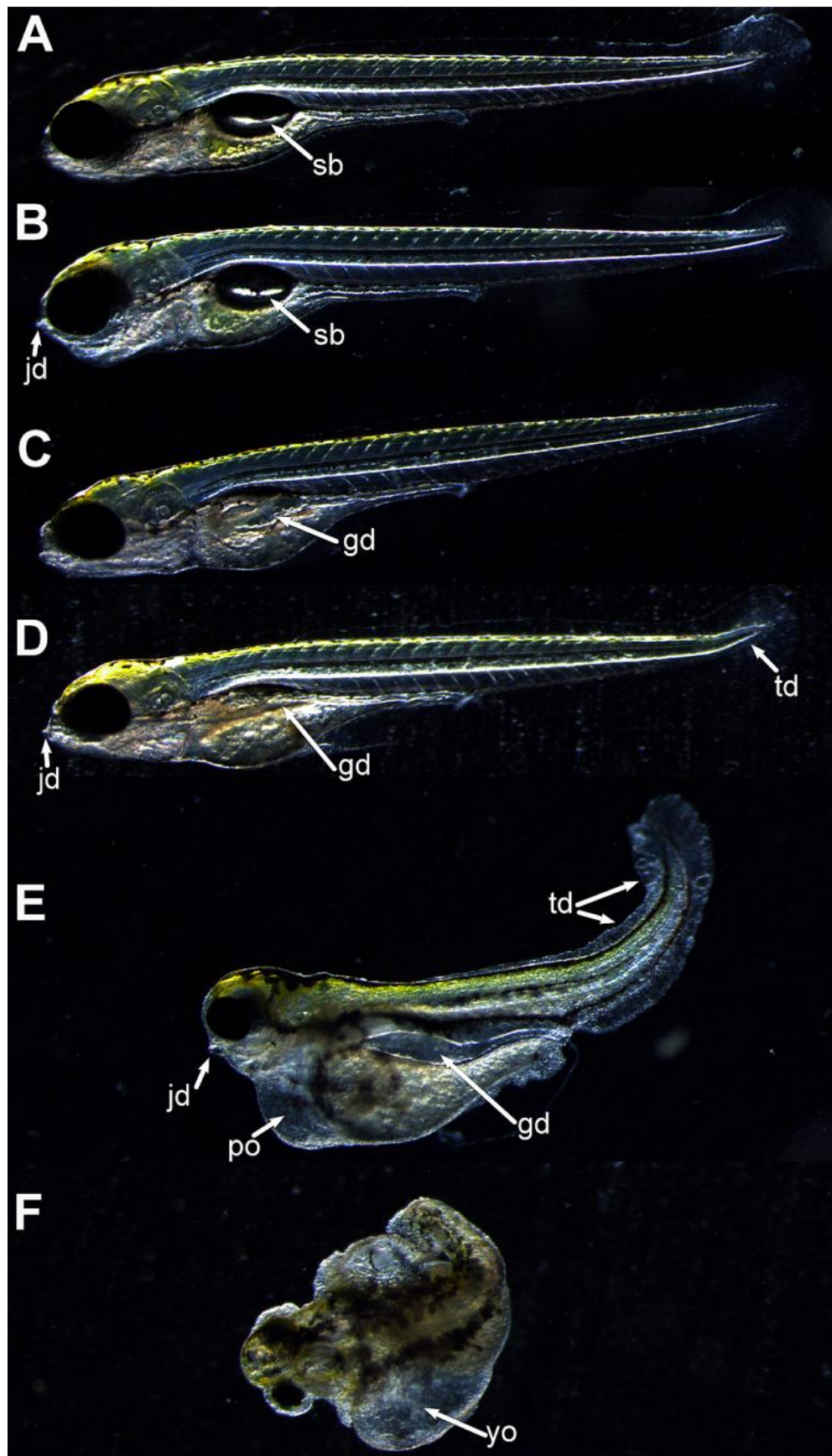
A BP-3 az előző bekezdésekben említett fejlődési rendellenességeken túl állkapocs deformációt is okozott, melyet több egyednél is megfigyeltem (2. kép B, D, E). A torz állkapcsú egyedek száma nem növekedett a koncentrációval, viszont több koncentráció csoportban (1 mg/L, 7 mg/L, 12 mg/L, 18 mg/L; 4,38 µM, 30,7 µM, 52,6 µM és 78,9 µM) is előfordult ez a deformáció.

Teraoka és mtsai (2002) a 2,3,7,8-TCDD hatását vizsgálták zebradánió embriókon 0,438 nM és 4,38 nM koncentrációk között. A 2,3,7,8-TCDD az embriók alsó állkapcsában hátrányosan befolyásolta a porcképződést (kondrogenézis), mely az állkapocs deformációjához vezetett. A 2,3,7,8-TCDD koncentráció-függő módon csökkentette az alsó állkapocs hosszát, mivel a koncentráció növekedésével egyre rövidebb lett az alsó állkapocs. Teraoka és mtsai (2002) vizsgálatukban feltárták, hogy a 2,3,7,8-TCDD a zebradánió embrió alsó állkapcsára egy, az AhR által szabályozott folyamat révén fejtette ki a hatását.

Fong és mtsai (2016) a benzofenon-2 (BP-2) hatását vizsgálták szintén zebradánió embriók egyedfejlődésére. A BP-2 40 µM és 50 µM koncentrációban állkapocs deformációt

okozott, hasonlóan a BP-3-hoz. Elképzelhető, hogy az állkapocs deformációt a többi BP-típusú vegyület is képes kiváltani.

A BP-3 által zebradánió embriókon kiváltott fejlődési rendellenességek, illetve a kelési siker vizsgálata a környezetből eddig kimutatott legmagasabb BP-3 koncentráció (3,3 µg/L, Tarazona et al., 2010) feletti tartományban zajlott. Az elvégzett zebradánió embrió teszt így nem ad betekintést abba, hogy a környezetben előforduló koncentrációban van-e a vegyületnek teratogén hatása, azonban segíti a BP-3 hatásmechanizmusának megismerését.



2. kép: A negatív kontrollból (A) származó, normál fejlődésű és a benzofenon-3 kezelési csoportokból (B= 1 mg/L; C= 5 mg/L; D= 7 mg/L; E= 12 mg/L; F= 18 mg/L) származó, fejlődési rendellenességet mutató zebraadánió (*Danio rerio*) embriók, ahol sb: úszóhólyag; jd: állkapocs deformáció; gd: béltágulat; td: fark deformáció; po: perikardiális ödéma; yo: sziködéma. (Leica M205FA sztereomikroszkóp, Leica Microsystems GmbH, Németország) (Forrás: Dr. Kovács Róbert, SZIE Halgazdálkodási Tanszék)

### 5.1.2.3. Új tudományos eredmények (az 5.1.2 fejezet alapján)

**4. tézis:** A 120 órás zebradánió (*Danio rerio*) embrió teszt alapján megállapítható, hogy a benzofenon-3 (BP-3) letális az embriókra ( $LC_{50,120hp} = 12,14 \pm 0,98$  mg/L), továbbá olyan fejlődési rendellenességeket eredményez, mint torz farki rész, az úszóhólyag feltöltésének hiánya, illetve állkapocs deformáció. Ezenkívül a BP-3 csökkenti a zebradánió embriók kelési sikerét is.

A 4. tézisbe foglalt eredmények a következő publikációban jelentek meg:

Balázs, A., Krifaton, Cs., Orosz, I., Szoboszlai, S., Kovács, R., Csenki, Zs., Urbányi, B., Kriszt, B. (2016): Hormonal activity, cytotoxicity and developmental toxicity of UV filters. *Ecotoxicology & Environmental Safety* 131: 45–53. (IF: 3,974; Q1)

## **5.2. Biodegradációs kísérletek 5 $\alpha$ -dihidrotesztozteronnal**

### **5.2.1. Biodegradáció élő sejtekkel**

A 4.2.1 fejezetben leírt és elvégzett DHT biodegradációs kísérletből származó minták analitikai vizsgálata (GC-MS) alapján (15. táblázat) a DHT kezdeti koncentrációja megmaradt a 72 órás vizsgálat során a kontrollban. A bontási képességgel nem rendelkező kontroll *E. coli* TOP10-es törzs esetében azonban 10%-os megtapadást tapasztaltam a pelleten. A vizsgált törzsek kiváló DHT biodegradációs képességgel rendelkeztek, mivel a meghatározási határérték alá csökkent a DHT koncentrációja mind a pellet, mind a felülúszó mintákban. Az *E. coli* TOP10-es törzs nem adott megfelelő becslést a vizsgált *Rhodococcus* és *Cupriavidus* törzsek esetében a DHT pelleten történő megtapadására, így az *E. coli* TOP10-es törzs alkalmazása e törzsekkel végzett későbbi vizsgálatokban nem szükséges.

A BLYR törzsszel végzett, a 4.2.3.2 fejezetben leírt vizsgálat alapján sejttoxikus hatást nem tapasztaltam a 72 órás vizsgálat során, mivel a felülúszó minták nem okoztak biolumineszcencia gátlást a BLYR tesztstruktúrájánál (15. táblázat).

A BLYAS teszt (4.2.3.2 fejezet) eredményeit (15. táblázat) biolumineszcencia intenzifikáció (%) értékben fejeztem ki (2. egyenlet). A kontrollban a kiindulási DHT koncentráció 550%-kal növelte a BLYAS tesztstruktúra alap biolumineszcenciáját, míg az *E. coli* TOP10-es törzs esetében 485%-os biolumineszcencia intenzifikáció volt tapasztalható. Az alacsonyabb biolumineszcencia intenzifikáció oka a DHT pelleten való megkötődése (10%). A vizsgálat során 10-ből 9 törzs esetében a kontroll által kiváltott hatás csupán 4-12%-át mértem (24,5-63,7% biolumineszcencia intenzifikáció). A *C. basilensis* ÖR16 esetében habár a

kontrollhoz képest csökkent a felülúszó androgén aktivitása (a kontroll érték 36%-a), a biodetoxifikációs potenciál elégtelen volt, mivel még közel 200%-os biolumineszcencia intenzifikációt mértem (15. táblázat), tehát a DHT bontása magas androgén potenciállal rendelkező metabolitokig ment végbe.

**15. táblázat:** A biodegradációs kísérlet 72. órájában levett minták 5 $\alpha$ -dihidrotesztoszteron tartalma gázkromatográfia-tömegspektrometriás mérés alapján, illetve a minták androgén és sejttoxikus hatása a *Saccharomyces cerevisiae* BLYAS és BLYR törzsekkel vizsgálva. A táblázatban átlag értékek szerepelnek szórással, kivéve az *Escherichia coli* TOP10-es törzs (lásd 4.2.3.1 fejezet).

Mikrobatörzs	GC-MS		BLYAS teszt	BLYR teszt
	(μg/L)		Biolumineszcencia (%)	
	Felülúszó	Pellet	Felülúszó	
<b>Kontroll</b>	<b>117 (± 14,8)</b>	<b>n.a.</b>	<b>550,3 (± 29,2)</b>	<b>10,5 (± 8,6)</b>
<i>Escherichia coli</i> TOP10	70 (± 9,3)	10,4	484,6 (± 36,2)	6,5 (± 5,4)
<i>Rhodococcus gordoniae</i> AK38	< 1	< 0,66	24,5 (± 9,0)	-9,2 (± 8,0)
<i>Rhodococcus coprophilus</i> N774	< 1	< 0,66	30,7 (± 15,9)	-14,1 (± 4,5)
<i>Cupriavidus basilensis</i> BRB6A	< 1	< 0,66	31,6 (± 7,5)	-9,2 (± 3,5)
<i>Rhodococcus globerulus</i> AK36	< 1	< 0,66	41,2 (± 10,6)	-11,5 (± 7,2)
<i>Rhodococcus erythropolis</i> AK35	< 1	< 0,66	41,7 (± 2,0)	-10,7 (± 4,2)
<i>Rhodococcus pyridinivorans</i> AK37	< 1	< 0,66	42,2 (± 24,3)	-8,2 (± 7,6)
<i>Rhodococcus aetherivorans</i> AK44	< 1	< 0,66	46,7 (± 13,7)	-9,6 (± 6,0)
<i>Rhodococcus pyridinivorans</i> K402	< 1	< 0,66	51,5 (± 7,9)	-7,8 (± 4,8)
<i>Rhodococcus ruber</i> AK41	< 1	< 0,66	63,7 (± 24,8)	-18,6 (± 4,3)
<i>Cupriavidus basilensis</i> ÖR16	< 1	< 0,66	198,3 (± 69,2)	-8,1 (± 0,8)

Annak érdekében, hogy felderítsem, a bontási idő növelésével a *C. basilensis* ÖR16 képes-e az androgén potenciállal rendelkező metabolitokat is biodetoxifikálni, megismételtem a biodegradációs kísérletet (4.2.1 fejezet) 7 napra növelt inkubációs idővel. A felülúszó minták androgén hatásának vizsgálata alapján a *C. basilensis* ÖR16 7 nap alatt sem tudott teljes biodetoxifikációt elérni, mivel a 7. napon is jelentős androgén hatást mértem a kontrollhoz képest (16. táblázat).

16. táblázat: 5 $\alpha$ -dihidrotesztoszteron bontási kísérlet kezdetén és 7. napján levett felülúszó minták androgén hatása átlagos biolumineszcencia intenzifikáció értékben megadva

Mintavétel időpontja (nap)	Kontroll Biolumineszcencia intenzifikáció (%)	<i>Cupriavidus basilensis</i> ÓR16 Biolumineszcencia intenzifikáció (%)
0.	441 $\pm$ 22	417 $\pm$ 4
7.	447 $\pm$ 5	237 $\pm$ 8

Az androgén potenciál csökkentéséhez több olyan enzim is szükséges, melyek a molekula androgén hatásért felelős részén mutatnak aktivitást. Az androgén aktivitásban a szteránváz 17-es szénatomján lévő,  $\beta$  helyzetű OH-csoportnak esszenciális jelentősége van, mivel az androgén receptorhoz való kötődésben játszik szerepet. Az androgén aktivitást az 5-ös szénatomon lévő hidrogén térállása is befolyásolja. A hidrogén  $\alpha$  helyzete magasabb androgén aktivitással jár, mint a  $\beta$  helyzet, mivel az  $\alpha$  térállás miatt a molekula hatékonyabban tud a receptorhoz kötődni. Az androgén aktivitást csökkenti, ha a 3-as szénatomon lévő keto-csoport OH-csoporttá alakul, illetve ha a 3-as szénatomon lévő OH-csoport  $\beta$  helyett  $\alpha$  térállásba kerül (Bovee et al., 2008). A szakirodalom szerint a szteroid gyűrűrendszer felnyitásának folyamata magába foglalja a 9-es szénatomon alfa helyzetű hidroxil-csoport (3-ketoszteroid-9 $\alpha$ -hidroxiláz enzim) és a 17-es szénatomon keto-csoport (17 $\beta$ -hidroxiszteroid-dehidrogenáz enzim) kialakítását. Továbbá az 1-es és a 2-es szénatomok közötti kettős kötés kialakítását, azaz a  $\Delta^1$ -dehidrogénezést (3-ketoszteroid- $\Delta^1$ -dehidrogenáz enzim), illetve a 4-es és az 5-ös szénatomok közötti kettős kötés kialakítását, azaz a  $\Delta^4$ -dehidrogénezést (3-ketoszteroid- $\Delta^4$ -dehidrogenáz enzim). Az enzimátikus átalakítások során 9 $\alpha$ -hidroxi-1,4-androsztadién-3,17-dion keletkezik, melynél spontán kötés-átrendeződés következtében felnyílik a B gyűrű (Itagaki et al., 1990; Kim et al., 2007; Knol et al., 2008; van der Geize et al., 2002; van der Geize et al., 2007).

A DHT bontási kísérletben vizsgált törzsek közül eddig csupán a *Rhodococcus pyridinivorans* AK37 esetében lettek szteroid bontásban szerepet játszó gének azonosítva. A törzsben megtalálhatóak a 3-ketoszteroid-9 $\alpha$ -hidroxiláz, 3-ketoszteroid- $\Delta^1$ -dehidrogenáz, a 3-ketoszteroid- $\Delta^4$ -dehidrogenáz és a szteroid- $\Delta^4$ -izomeráz enzimek (Kriszt et al., 2012), melyek révén a törzs kiváló DHT biodetoxifikációs potenciált érhetett el. A *Cupriavidus basilensis* ÓR16 esetében habár az androgén hatás csökkent a kontrollhoz képest, az még jelentős maradt, így feltehetőleg a B gyűrű felnyitásához szükséges kulcsenzimek közül nem mindegyik található meg a törzsben.



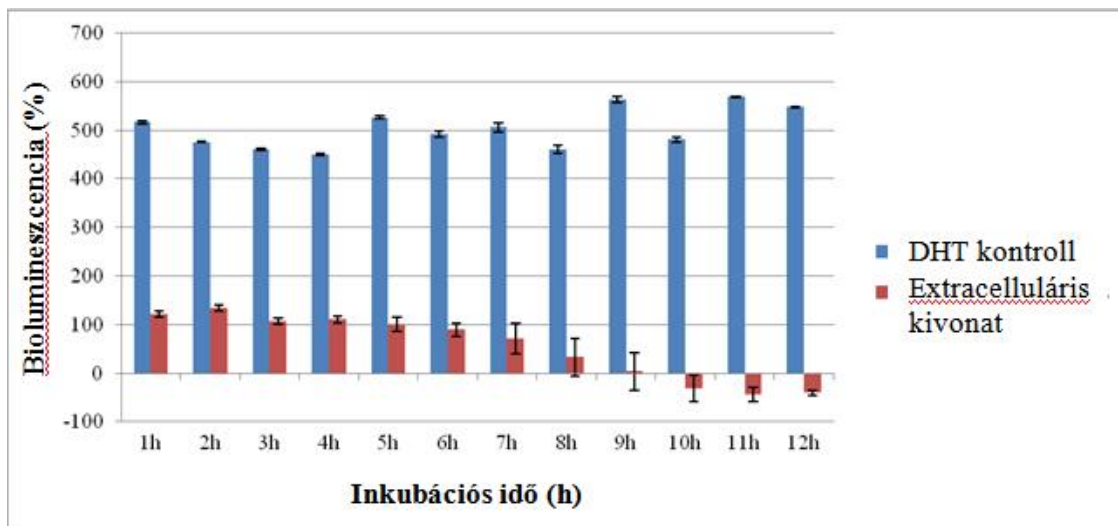
### 5.2.2. Biodegradáció extracelluláris kivonattal

A *Rhodococcus pyridinivorans* AK37 extracelluláris kivonatával végzett DHT biodegradációs kísérletet a 4.2.2 fejezetben leírt eljárás alapján végeztem el. A GC-MS vizsgálat alapján (17. táblázat) a tápoldatot és DHT-t tartalmazó kontrollban mért DHT koncentráció megegyezett a hőkezelt és 1 mg/mL proteináz K + 0,1% SDS kezelt extracelluláris kivonattal adalékolt tápoldat DHT koncentrációjával. Ezzel szemben a *R. pyridinivorans* AK37 előkezelés nélküli extracelluláris kivonatával adalékolt tápoldatban a DHT koncentrációja a meghatározási határérték alá csökkent a 12. órára (17. táblázat).

17. táblázat: *Rhodococcus pyridinivorans* AK37 aktív, illetve inaktív extracelluláris kivonatában GC-MS módszerrel mért átlagos *5 $\alpha$* -dihidrotesztozteron (DHT) koncentráció 12 órás inkubációt követően

Minták	DHT koncentráció ( $\mu\text{g/L}$ )
DHT kontroll	$65 \pm 6,54$
Hőkezelt extracelluláris kivonat	$61 \pm 8,26$
Proteináz K + 0,1% SDS kezelt extracelluláris kivonat	$61 \pm 4,35$
Kezelésmentes (aktív) extracelluláris kivonat	< 1

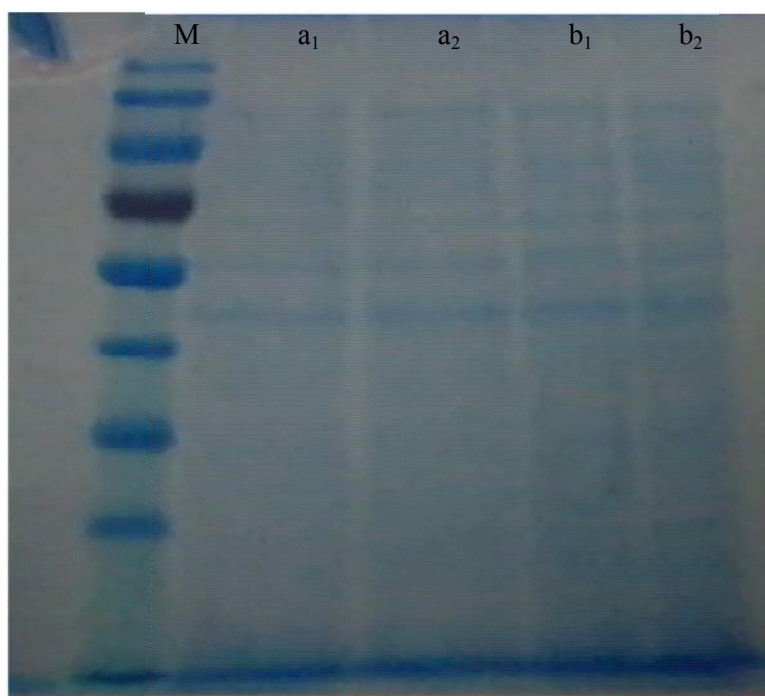
A BLYAS tesztszervezettel végzett vizsgálat alapján (4.2.3.2 fejezet) már az 1. órában az androgén hatás jelentős csökkenését tapasztaltam az AK37-es törzs kezelésmentes extracelluláris kivonatával adalékolt tápoldatban a kontrollhoz képest. Az androgén aktivitás a 9. órára szűnt meg teljesen (20. ábra).



20. ábra: Az 5 $\alpha$ -dihidrotesztoszetrón (DHT) *Rhodococcus pyridinivorans* AK37 extracelluláris kivonatával történő biodegradációjának nyomon követése *Saccharomyces cerevisiae* BLYAS törzssel

Az eredmények alapján megállapítható, hogy a DHT teljes biodegradációjára és biodetoxifikációjára képesek az AK37-es törzs extracelluláris enzimeit 12 óra alatt.

A következő extracelluláris kivonattal végzett vizsgálat (4.2.2 fejezet) a DHT bontásában részt vevő enzimek indukált vagy konstitutív termelésének meghatározására irányult. E kísérlet eredménye alapján a DHT-val előinkubált (21. ábra a<sub>1</sub> és a<sub>2</sub>) *R. pyridinivorans* AK37 extracelluláris kivonatának SDS-PAGE módszerrel felvett fehérje profilja megegyezett a DHT előinkubáció nélküli (21. ábra b<sub>1</sub> és b<sub>2</sub>) AK37-es törzs extracelluláris kivonatának fehérje profiljával. Az SDS-PAGE módszer eredménye alapján feltételezhető, hogy a DHT bontásában részt vevő enzimek konstitutívan termelődnek. Megerősítő vizsgálatként azonban a kétdimenziós poliakrilamid gélelektroforézis (2D PAGE) módszer elvégzésére van szükség, mely a fehérjék hatékonyabb elválasztását teszi lehetővé.



**21. ábra: A *Rhodococcus pyridinivorans* AK37 extracelluláris kivonatának fehérje profilja 2 párhuzamos vizsgálatban {a: 5 $\alpha$ -dihidrotesztoszteronnal (DHT) előinkubált; b: DHT előinkubáció nélküli; M: molekula markerek [Thermo Scientific-PageRuler Prestained Protein Ladder (170, 130, 100, 70, 55, 40, 35, 25 kDa)]}. (A kép szerzője Dr. Tóth Ákos)**

### 5.2.3. Új tudományos eredmények (az 5.2 fejezet alapján)

**5. tézis:** Az 5 $\alpha$ -dihidrotesztoszteron (DHT) 72 órás biodegradációs kísérletben sikeresen azonosítottam kiváló biodegradációs és biodetoxifikációs potenciállal rendelkező baktérium törzseket, melyek közül 8 a *Rhodococcus* és 1 a *Cupriavidus* nemzetségbe tartozik. Ezek közül a *R. pyridinivorans* AK37 extracelluláris kivonata már 12 óra alatt a meghatározási szint alá csökkentette a DHT koncentrációját. Az androgén aktivitás 9 óra alatt szűnt meg teljesen.

Az 5. tézisbe foglalt eredmények a következő publikációban jelentek meg:

Balázs, A., Krifaton, Cs., Risa, A., Cserháti, M., Kukolya, J., Szoboszlay, S., Háhn, J., Eldridge, M., Wang, J., Kriszt, B. (2014): Biodegradation of 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone to non-androgenic products. *International Biodeterioration & Biodegradation* 93: 162-167. (IF: 3,562; Q2)

## 6. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

A sejttöxikus hatást mérő *S. cerevisiae* BLYR törzs a 4 vizsgált UV-szűrő közül a BP-3 esetében jelzett sejttöxikus hatást, így a vegyület esetében a hormonhatás egyértelmű meghatározása a *S. cerevisiae* BLYES és BLYAS törzsekkel addig a koncentrációig lehetséges, mely még nem toxikus a BLYR törzsre. Eredményemmel ellentétben Kunz és Fent (2006) vizsgálatában a BP-3 nem volt sejttöxikus hatású a rekombináns *S. cerevisiae* törzsre a sejtszaporodás mérése alapján. A különbség feltehetőleg abból adódott, hogy a biolumineszcencia érzékenyebben jelzi a BP-3 sejttöxikus hatását. Mindemellett a BLYR törzs hatékony kontrollnak tekinthető, hiszen a hormonhatás és a sejttöxikus hatás meghatározása is biolumineszcencia alapú, míg Kunz és Fent (2006) a hormonhatást a  $\beta$ -galaktozidáz enzim aktivitása alapján mérték.

A 4MBC, EHMC és OC esetében a BLYR törzs nem jelzett sejttöxikus hatást. A szakirodalom szerint azonban a 4MBC és az EHMC más tesztorganizmokra – pl. algák (Paredes et al., 2014; Sieratowicz et al., 2011), *Tetrahymena thermophila* (Gao et al., 2013) – sejttöxikusak lehetnek. Az OC esetében még nem állnak rendelkezésre egysejtűeken végzett ökotoxikológiai vizsgálatok. Toxicitásukat így célszerű tovább vizsgálni vízi szervezeteken.

A BP-3 sejttöxikus hatása miatt a *S. cerevisiae* BLYES és BLYAS törzsek nem voltak alkalmasak a vegyület ösztrogén, antiösztrogén és antiandrogén hatásának meghatározására, illetve számszerűsítésére, mivel a koncentráció-válasz görbék átfedtek a sejttöxikus tartománnyal. A 4MBC antiösztrogén hatásának meghatározására sem volt megfelelő a BLYES törzs, mivel a törzs nem volt elég érzékeny a vegyület oldhatósági tartományán belül.

Az OC esetében, az antiandrogén tesztben nem-monoton koncentráció-válasz görbét kaptam. A feltételezett hatásmechanizmus – mely szerint az OC az alacsony koncentráció tartományban a receptor másodlagos kötőhelyéhez kapcsolódik, majd a magasabb koncentráció tartományban kompetíció lép fel az OC és a DHT között az elsődleges kötőhelyért (Collins et al., 1997) – igazolásához kompetíciós receptor-kötődési vizsgálatra, illetve matematikai modellezésre van szükség.

A 4 UV-szűrő agonista és antagonistá ED hatásának vizsgálata során a *S. cerevisiae* BLYES és BLYAS törzsek nem mutatkoztak érzékenyebbnak, mint más *in vitro* hormonhatást mérő tesztorganizmokra, kivéve a 4MBC ösztrogén hatásának mérése esetében, ahol a BLYES törzs érzékenyebb volt, mint a rekombináns *S. cerevisiae* törzs. A BLYES törzs litikáz enzim

nélkül is képes a 4MBC parciális ösztrogén hatását kimutatni, tehát a BLYES törzs sejtfala átjárhatóbb a vegyület számára, mint a rekombináns *S. cerevisiae* törzse.

A környezetben mért maximális koncentráció a BP-3 esetében 3,3 µg/L (Tarazona et al., 2010), a 4MBC esetében 2,7 µg/L (Balmer et al., 2005), az EHMC esetében 1,04 µg/L (Kameda et al., 2011), míg az OC esetében 7 µg/L (Langford et al., 2015). A *S. cerevisiae* BLYES és BLYAS törzsek a vizsgált UV-szűrők ösztrogén, antiösztrogén és antiandrogén hatását a környezetileg jelenleg releváns koncentrációknál magasabb koncentráció tartományban jelezték. Az eredmények alapján megállapítható, hogy a BLYES és BLYAS törzsek nem eléggé érzékenyek a vizsgált UV-szűrők agonista és antagonist ED hatásának meghatározására környezetileg jelenleg releváns koncentrációban. Mindemellett alkalmasak lehetnek a vegyületek mikrobiális biodegradációjának megvalósítása során a biodetoxifikáció nyomon követésére kísérleti körülmények között. A szakirodalomban kevés olyan vizsgálat található, melyekben a 4 UV-szűrő hormonhatását a környezetben maximálisan kimutatott koncentrációban tesztelték. Felnőtt zebradánió heréjében 2,4 µg/L BP-3 szignifikánsan növelte a szteroid metabolizmusban szerepet játszó P450 aromataz A-t kódoló gén átíródását (Blüthgen et al., 2012). Az EHMC 2,2 µg/L koncentrációban szignifikánsan befolyásolta az *era*, az *erβ*, az *ar* és a *17β-hsd* 3 gén átíródását zebradánióban (Zucchi et al., 2011). Eredményeim és a szakirodalmi adatok alapján a 4 UV-szűrő hormonhatását környezetileg releváns koncentrációkban vízi szervezeteken (zebradánió, japán medaka, karmosbéka, árvaszúnyog, vízi csigák) érdemes feltérképezni a hormonháztartáshoz kapcsolódó gének expressziójának vizsgálata alapján. A génexpressziós vizsgálatok segítségével a hatásmechanizmusok is megismerhetővé válnak.

Az emberek esetében azonban nem a környezeti expozíció, hanem a kozmetikumok alkalmazása jelenti a legnagyobb UV-szűrőknek való kitettséget. Számítások szerint egy átlagos testtömegű férfi több mint 2 mg/ttkg dózisban juttat UV-szűrőt a szervezetébe egyszeri expozícióval, amennyiben 10%-os UV-szűrő tartalmú naptejet a teljes testfelületén alkalmaz (2 mg/cm<sup>2</sup>), és 5%-os dermális abszorpciót feltételezünk (Ruszkiewicz et al., 2017). A bőrön keresztül felszívódó UV-szűrők így olyan koncentrációt érhetnek el a szervezetben, melynél a BLYES/BLYAS/BLYR tesztekben és a vízi tesztszervezetekkel végzett vizsgálataimban ED hatás vagy egyéb toxikus hatás jelentkezett. Továbbá Carou és mtsai (2008) hím Wistar patkányokat 2 napon keresztül 2 mg/ttkg/nap dózisban 4MBC-ral kezelve a LH és a FSH vérszérumbeli koncentrációjának szignifikáns csökkenését tapasztalták. Mivel a kozmetikumok általában több UV-szűrőt is tartalmaznak, illetve az emberek naponta többször is használnak ilyen kozmetikumokat, így még jelentősebb kitettséggel számolhatunk. Ezek alapján fontos lenne felülvizsgálni, hogy mekkora koncentrációban tartalmazzon UV-szűrő vegyületet egy adott

kozmetikum. A tényleges kitettség és kockázat megállapításához az egyes UV-szűrők dermális abszorpciójának pontos meghatározására és a vegyületek szervezetbeli eloszlásának, illetve metabolizmusának megismerésére van szükség.

A BP-3 vízi szervezetekre kifejtett hatásáról még kevés ismerettel rendelkezünk, a vizsgálatba vont vízi tesztorganizmusok és az elvégzett kísérletek – főként a krónikus tesztek – száma jelenleg még elenyésző. Vizsgálataimhoz az *A. fischeri* baktériumot és a zebradániót választottam ki. A BP-3 toxikusnak bizonyult mindkét tesztorganizmusra. Az *A. fischeri* baktériummal kapott eredményemet összehasonlítva a szakirodalmi adatokkal megállapítható, hogy fontos a vegyületek toxicitásának meghatározásához az inkubációs idő optimalizálása, mivel a 15 perces kontaktidejű teszt (Zhang et al., 2017) magasabb IC<sub>50</sub> értéket eredményezett. Továbbá a magasabb koncentrációjú oldószer alkalmazása növelhette a BP-3 biológiai hozzáférhetőségét.

A vízi tesztorganizmusokkal kapott eredményeim alapján a BP-3 a környezetben eddig mért legmagasabb koncentrációjánál több nagyságrenddel magasabb koncentrációban fejtette ki a hatását. Az *A. fischeri* baktérium azonban alkalmas lehet a BP-3 mikrobiális biodegradációjának megvalósítása során a biodetoxifikáció nyomon követésére adott koncentráció tartományban, kísérleti körülmények között, mivel a BP-3 koncentrációfüggő módon gátolta az *A. fischeri* baktérium biolumineszcenciáját. A vegyület kockázata azonban más vízi szervezetekre nem tekinthető elhanyagolhatónak, hiszen az *Isochrysis galbana* alga, a *Stylophora pistillata* korall lárvák, a *Tetrahymena thermophila* és felnőtt, hím zebradánió esetében, környezetileg releváns koncentrációkban káros hatásokat okozott (Blüthgen et al., 2012; Downs et al., 2016; Gao et al., 2013; Loraine & Pettigrove 2006; Paredes et al., 2014). Érdekes lenne akut tesztek mellett krónikus vizsgálatokat is végezni. Ezt alátámasztja a zebradánió embrió teszt azon eredménye, mely szerint az idő előrehaladtával az LC<sub>50</sub> értékek csökkenő trendje volt megfigyelhető. Tehát elképzelhető, hogy a környezetben alacsonyabb koncentrációban előforduló BP-3 hosszútávon hasonló hatást fejt ki, mint azt az akut tesztben tapasztaltam.

A BP-3 zebradánió embriókra gyakorolt hatására különböző fejlődési rendellenességek léptek fel, mint pl. torz farkok, az úszóhólyag feltöltésének hiánya és állkapocs deformáció, tehát a BP-3 teratogén hatású a zebradánió embriókra. A jövőben fontos lenne az elváltozások kialakulásának mechanizmusait megismerni.

A zebradánió embrióknál tapasztalt torz farki rész kialakulásához a keringési rendellenességen túl a farki részben bekövetkező apoptózis, illetve az izomrostok elváltozása is vezethetett. Az apoptózis vizsgálatához akridinnarancs festésre és fluoreszcens mikroszkópra

van szükség (Usenko et al., 2007), míg az izomrostok elváltozását mikroszkópos szövettani vizsgálattal (Huang et al., 2010) célszerű tanulmányozni.

A torz farokrész akadályozhatta a zebradániókat a víz-levegő határfelülethez való felúszáshoz, és így hozzájárulhatott az úszóhólyag feltöltésének hiányához. Fontos megvizsgálni azt is, hogy a BP-3 gátolja-e a felületaktív vegyület bioszintézisét a zebradánió gázmirigy sejtjeiben, mivel a felületaktív vegyületnek fontos szerepe van az úszóhólyag feltöltésében (Prem et al., 2000). A BP-3 úszóhólyagra kifejtett hatásának részletesebb megismeréséhez célszerű azt is meghatározni, hogy azoknál a kezelt csoportoknál, ahol az úszóhólyag feltöltődött, volt-e különbség a kontroll csoporthoz képest az úszóhólyag térfogatában.

Teraoka és mtsai (2002) vizsgálatukban feltárták, hogy a 2,3,7,8-TCDD a zebradánió embrió alsó állkapcsára egy, az AhR által szabályozott folyamat révén fejtette ki a hatását, így érdemes a BP-3 esetében is vizsgálni, hogy a vegyület képes-e az AhR-hoz kötődni. A kísérlethez egy új bioripporter, a genomján az *ahr* gént tartalmazó, biolumineszcens *Saccharomyces cerevisiae* törzs (Leskinen et al., 2008) beszerzésére van szükség. Mivel Fong és mtsai (2016) a BP-2 esetében is tapasztaltak állkapocs deformációt a zebradánió embrióknál, így elképzelhető, hogy e fejlődési rendellenesség a többi BP-típusú vegyület hatására is előfordul. Célszerű a jövőben a többi BP-típusú vegyület esetében is vizsgálni, hogy képesek-e állkapocs deformációt okozni, illetve hogy kapcsolódnak-e az AhR-hoz.

A BP-3 a zebradánió embriók kelési sikerét is csökkentette, így fontos megvizsgálni, hogy a BP-3 befolyásolja-e a kelésben szerepet játszó ZHE1 enzimet kódoló gén átíródását.

A BP-3 esetében tapasztalt sejttoxicitási és embrió toxicitási eredményeket, illetve a szakirodalmi adatokat figyelembe véve, fontos feladat a vegyület mikrobiális biodetoxifikációjának megvalósítása is.

A DHT biodegradációs kísérletben hatékony biodetoxifikációt mutató törzsek gyakorlati, biodegradációs célú felhasználásához érdemes még megvizsgálni, hogy a törzsek milyen más szennyezőket képesek hatékonyan biodetoxifikálni, mely mikrobákkal képesek együtt szaporodni, illetve hogy az adott konzorcium hatékonyabb biodetoxifikációs potenciállal rendelkezik-e, mint a konzorciumot alkotó törzsek külön-külön. Ezenkívül fontos vizsgálni, hogy a törzsek milyen biofilmképző képességgel jellemezhetők.

A *Cupriavidus basilensis* ÓR16 esetében a DHT bontási kísérlet 3. napján is jelentős mértékű androgén hatást mértem a *S. cerevisiae* BLYAS törzssel, habár az analitikai vizsgálatok alapján a törzs meghatározási határ alá csökkentette a DHT koncentrációját. Ez az eredmény

rávilágít a biológiai hatásmérő tesztek fontosságára az analitikai vizsgálatok mellett, hiszen kiváló DHT bontás mellett is tapasztalhatunk még jelentős androgén aktivitást.

A *C. basilensis* ÖR16 korábbi kísérletek során jó szénhidrogén és mikotoxin bontó törzsnek bizonyult, és számos módon képes aromás gyűrű felnyitására (Cserhádi et al., 2012). Ennek ellenére a törzs 7 nap alatt sem tudta megszüntetni az androgén aktivitást a DHT bontási kísérletben. Feltételezhetően a törzs nem rendelkezik az összes, szteroid bontáshoz szükséges enzimmel.

A DHT bontási kísérlet eredményei arra is felhívják a figyelmet, hogy jelentős különbségek lehetnek egyazon fajhoz tartozó törzsek biodetoxifikációs potenciálja között. A *C. basilensis* BRB6A kiváló, míg a *C. basilensis* ÖR16 elégtelen biodetoxifikációs képességgel rendelkezett. A különbség feltárásához érdemes lehet a DHT biodegradációjának analitikai módszerrel való nyomon követése és a keletkező metabolitok beazonosítása, így meghatározható, hogy a törzsek mely vegyületekig képesek bontani a DHT-t. A genomszekvencia elemzésével pedig azonosíthatók szteroid bontásban szerepet játszó gének.

A *R. pyridinivorans* AK37 extracelluláris kivonata kiválóan bontotta a DHT-t már 12 óra alatt. Következő kutatási irányként javasolható az AK37-es törzs segítségével a DHT bontásában résztvevő extracelluláris enzimek beazonosítása és a bontási útvonal feltérképezése. A *R. pyridinivorans* AK37-es törzs genomszekvenciájának meghatározása során Kriszt és mtsai (2012) olyan géneket azonosítottak, melyeknek a szteroid bontásban van szerepük. Az azonosított gének a 3-ketoszteroid-9 $\alpha$ -hidroxiláz, 3-ketoszteroid- $\delta$ -dehidrogenáz, 3-ketoszteroid-1-dehidrogenáz és szteroid- $\delta$ -izomeráz enzimeket kódolják. A felsorolt gének a *Rhodococcus* nemzetséghez tartozó törzsekben általánosan megtalálhatóak (Yang et al., 2011). A kísérlethez az AK37-es törzs ismert, szteroid bontó enzimet kódoló génjeit külön-külön, illetve különböző kombinációkban *E. coli* baktériumba kell klónozni, majd a klónok DHT bontási képességét a BLYAS teszt segítségével ellenőrizni.

A DHT bontásában szerepet játszó enzimek konstitutív vagy indukált termelődésének meghatározásához az SDS-PAGE módszer elvégzésére volt lehetőségem. A módszer alapján nem tapasztaltam különbséget a DHT-val előinkubált és az előinkubáció nélküli *R. pyridinivorans* AK37 extracelluláris kivonatának fehérjeprofilja között, tehát ezen eredmény az enzimtermelés konstitutív jellegére utal. Az SDS-PAGE módszer eredménye azonban nem elég a konstitutív enzimtermelés bizonyításához, így jövőbeni célom, hogy az enzimtermelődést 2D PAGE módszer segítségével is vizsgáljam, mely a fehérjék hatékonyabb elválasztását teszi lehetővé.



## 7. ÖSSZEFOGLALÁS

Doktori munkám során a szteroid  $5\alpha$ -dihidrotesztoszteron (DHT) biotransformációjának megvalósítását, továbbá UV-szűrők hormonhatásának és sejtoxikus hatásának vizsgálatát tűztem ki célul. Az UV-szűrők közül a környezetben gyakran kimutatható benzofenon-3-at (BP-3), 4-metilbenzilidén kámfort (4MBC), etilhexil-metoxicinnamátot (EHMC) és oktokrilént (OC) választottam ki.

A kiválasztott UV-szűrő vegyületek hormonhatását és sejtoxicitását a *Saccharomyces cerevisiae* BLYES, BLYAS és BLYR törzsek segítségével vizsgáltam. Sejtoxikus hatással egyedül a BP-3 rendelkezett, így a vegyület esetében a hormonhatást a BLYR törzssel kapott NOEC értékig ( $11,2 \pm 1,20 \mu\text{M}$ ) lehet egyértelműen megállapítani. E koncentrációtól a hormonhatást és a sejtoxikus hatást nem lehet elválasztani egymástól.

A *S. cerevisiae* BLYES törzs ösztrogén hatást a BP-3 és a 4MBC esetében jelzett. A szakirodalmi adatokkal összevetve, a BLYES törzs a 4MBC ösztrogén hatását tekintve nagyobb érzékenységgel rendelkezett, mint a rekombináns *S. cerevisiae* törzs, mely csak litikáz enzim segítségével jelzett ösztrogén hatást.

Androgén hatást egyik vizsgált UV-szűrő esetében sem mutattam ki a *S. cerevisiae* BLYAS törzssel.

A BLYES és BLYAS törzseket sikeresen adaptáltam antagonistá hatás mérésekhez a 4-hidroxitamoxifen és a flutamid esetében kapott eredmények alapján.

Antiösztrogén hatást a 4MBC, EHMC és OC esetében tapasztaltam a BLYES törzssel. A BP-3 esetében a BLYES törzs nem volt alkalmas a vegyület sejtoxikus hatása miatt az antiösztrogén hatás meghatározására.

Antiandrogén hatást mind a 4 UV-szűrő esetében kimutattam a BLYAS törzssel, ráadásul az OC esetében nem-monoton koncentráció-válasz görbét kaptam.

A BP-3 toxicitását vízi tesztszervezeteken is vizsgáltam. Az eredmények alapján a BP-3 citotoxikus volt az *Aliivibrio fischeri* baktériumra, illetve zebradánió (*Danio rerio*) embriók pusztulását okozta. A BP-3 zebradánió embriókra gyakorolt hatását vizsgálva, különböző fejlődési rendellenességeket is tapasztaltam, mint pl. torz farok, az úszóhólyag feltöltésének hiánya és állkapocs deformáció, továbbá a vegyület gátolta az embriók kelését is.

A DHT biotetoxifikációjának megvalósításához *Rhodococcus* és *Cupriavidus* nemzetségekbe tartozó baktérium törzseket választottam ki. A 72 órás bontási rendszerből származó minták DHT tartalmát GC-MS méréssel, míg androgén hatását a *S. cerevisiae* BLYAS törzssel határoztam meg. A kémiai analitikai vizsgálat alapján mind a 10 kiválasztott baktérium törzs képes volt a DHT biodegradációjára, azonban a biotetoxifikációs potenciál tekintetében különbségek adódtak az egyes törzsek között. A 10 vizsgált törzs közül 9 esetében az androgén hatás a kontroll androgén hatásának csupán 4-12%-a volt. A *Cupriavidus basilensis* ÓR16 esetében azonban még jelentős androgén hatást tapasztaltam. A bontási időt 7 napra növelve a törzs esetében továbbra sem csökkent az androgén hatás a felülúszóban, tehát a törzs nem alkalmas a DHT biotetoxifikációjára.

A sejtes bontás mellett a *Rhodococcus pyridinivorans* AK37-es törzs extracelluláris kivonatának segítségével is vizsgáltam a DHT bontását. Ezenkívül kísérletet végeztem az AK37-es törzs extracelluláris kivonatóval annak megállapítására, hogy a DHT bontásért felelős enzimek termelése indukált vagy konstitutív folyamat-e. A *R. pyridinivorans* AK37 extracelluláris kivonata már 12 óra alatt képes volt a DHT teljes biodegradációjára és biotetoxifikációjára. Az enzimtermelés konstitutív vagy indukált jellegének megállapításához a DHT előinkubált és előinkubáció nélküli *R. pyridinivorans* AK37 extracelluláris kivonatainak fehérjeprofilját SDS-PAGE módszerrel hasonlítottam össze. E módszer alapján az enzimtermelés konstitutívnek bizonyult. Ezen eredmény alátámasztásához azonban a 2D PAGE vizsgálat elvégzése is szükséges lenne.

Dolgozatom segíti a BP-3, 4MBC, EHMC és OC *in vitro* agonista és antagonistá ED hatásának megismerését, továbbá fontos információkat nyújt a BP-3 vízi élőlényekre gyakorolt kockázatának felméréséhez. Ezenkívül hozzájárul a DHT mikrobiális biotetoxifikációjának megvalósításához.

## 8. ENGLISH SUMMARY

The scope of this work was to investigate the biotransformation of the steroid 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone (DHT) and to determine the hormonal and cytotoxic activity of UV filters. Among UV filters benzophenone-3 (BP-3), 4-methylbenzylidene camphor (4MBC), ethylhexyl methoxycinnamate (EHMC) and octocrylene (OC) were tested as these compounds can be found in environmental matrices frequently.

*Saccharomyces cerevisiae* BLYES, BLYAS and BLYR strains were applied for detecting estrogenic, androgenic and cytotoxic effects of the selected UV filters. Only the BP-3 proved to be cytotoxic so the hormonal activity of this compound can be determined up to a concentration that reaches the NOEC value ( $11,2 \pm 1,20 \mu\text{M}$ ) calculated from the result of the BLYR experiment. Above that concentration value the hormonal and cytotoxic effect can not be distinguished from each other.

*S. cerevisiae* BLYES strain indicated estrogenic activity in the case of BP-3 and 4MBC. The BLYES strain was more sensitive regarding the estrogenic activity of 4MBC than the recombinant *S. cerevisiae* strain that was reported to detect the estrogenic activity of 4MBC only after a pretreatment with the enzyme lyticase.

*S. cerevisiae* BLYAS strain indicated no androgenic effect in the case of either tested UV filters.

BLYES and BLYAS strains were successfully adapted for testing antagonistic effects on the base of experiments carried out with 4-hydroxytamoxifen and flutamide.

Anti-estrogenic activity was detected in the case of 4MBC, EHMC and OC by the BLYES strain. For determining anti-estrogenic activity of BP-3 the BLYES strain was not suitable due to the cytotoxic effect of this compound.

The BLYAS strain indicated anti-androgenic activity in the case of the 4 tested UV filters moreover the anti-androgenic activity of OC can be characterized by nonmonotonic concentration-response curve.

Toxicity of BP-3 was tested on aquatic species as well. BP-3 proved to be cytotoxic to *Aliivibrio fischeri* and it was lethal to zebrafish (*Danio rerio*) embryos. BP-3 also caused developmental disorders to the embryos for example impaired tail, lack of swim bladder inflation and jaw deformity. Furthermore, this compound inhibited the hatching of the embryos.

Biodetoxification of DHT was carried out by *Rhodococcus* and *Cupriavidus* strains. The DHT concentration of samples taken in the 72<sup>nd</sup> hour of incubation, was determined by GC-MS while the androgenic activity of samples was measured by the *S. cerevisiae* BLYAS strain. According to the results of analytical measurements each one of the 10 tested strains was able to biodegrade DHT, however there were differences regarding biodetoxification. Nine out of the 10 tested strains reduced the androgenic activity of supernatant samples to 4-12% of the androgenic activity of the control sample. However, in the case of *C. basilensis* ÖR16 strain significant androgenic activity was experienced in supernatant samples. After increasing the incubation time to 7 days, no decreased androgenic activity was detected so this strain is not able to biodetoxify DHT.

DHT biodegradation was also investigated by extracellular extracts of *R. pyridinivorans* AK37 strain. Furthermore, experiment was carried out to determine whether the production of enzymes responsible for the biodegradation of DHT is constitutive or induced. The extracellular extracts of *R. pyridinivorans* AK37 strain could entirely biodegrade and biodetoxify DHT merely during 12 hours. Extracellular extracts of *R. pyridinivorans* AK37 strain with and without DHT preincubation were compared by SDS-PAGE method to determine whether enzyme production is constitutive or induced. According to the result of SDS-PAGE method the production of enzymes responsible for the biodegradation of DHT is constitutive. However, 2D PAGE method would be necessary to carry out for further improvement, too.

This work serves with additional informations regarding the *in vitro* agonistic and antagonistic activity of BP-3, 4MBC, EHMC and OC and the risk of BP-3 for aquatic species. Furthermore, results of experiments with DHT contribute to implement the microbial biodetoxification of DHT.

## 9. MELLÉKLETEK

### 9.1. Melléklet: Felhasznált irodalom

1. Alberts, J. F., Engelbrecht, Y., Steyn, P. S., Holzapfel, W. H., van Zyl, W. H. (2006): Biological degradation of aflatoxin B1 by *Rhodococcus erythropolis* cultures. *International Journal of Food Microbiology* 109: 121-126.
2. Alonso, M. B., Feo, M. L., Corcellas, C., Gago-Ferrero, P., Bertozzi, C. P., Marigo, J., Flach, L., Meirelles, A. C. O., Carvalho, V. L., Azevedo, A. F., Torres, J. P. M., Lailson-Brito, J., Malm, O., Diaz-Cruz, M S., Eljarrat, E., Barceló, D. (2015): Toxic heritage: Maternal transfer of pyrethroid insecticides and sunscreen agents in dolphins from Brazil. *Environmental Pollution* 207: 391-402.
3. Araneo, B. A., Dowell, T., Diegel, M., Daynes, R. A. (1991): Dihydrotestosterone exerts a depressive influence on the production of interleukin-4 (IL-4), IL-5, and  $\gamma$ -interferon, but not IL-2 by activated murine T cells. *Blood* 78(3): 688-699.
4. Axelstad, M., Boberg, J., Hougaard, K. S., Christiansen, S., Jacobsen, P. R., Mandrup, K. R., Nellemann, C., Lund, S. P., Hass, U. (2011): Effects of pre- and postnatal exposure to the UV-filter octyl methoxycinnamate (OMC) on the reproductive, auditory and neurological development of rat offspring. *Toxicology and Applied Pharmacology* 250(3): 278-290.
5. Balmer, M. E., Buser, H. R., Müller, M. D., Poiger, T. (2005): Occurrence of some organic UV filters in wastewater, in surface waters, and in fish from Swiss Lakes. *Environmental Science & Technology* 39(4): 953-962.
6. Bellet, V., Hernandez-Raquet, G., Dagnino, S., Seree, L., Pardon, P., Bancon-Montiny, C., Fenet, H., Creusot, N., Aït-Aïssa, S., Cavailles, V., Budzinski, H., Antignac, J.-P., Balaguer, P. (2012): Occurrence of androgens in sewage treatment plants influents is associated with antagonist activities on other steroid receptors. *Water Research* 46: 1912-1922.
7. Bergman, Å., Heindel, J., Jobling, S., Kidd, K., Zoeller, T. R. (2012): State-of-the-science of endocrine disrupting chemicals – 2012. *Toxicology Letters* 211: S3.
8. Blüthgen, N., Zucchi, S., Fent, K. (2012): Effects of the UV filter benzophenone-3 (oxybenzone) at low concentrations in zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicology and Applied Pharmacology* 263(2): 184-194.

9. Blüthgen, N., Meili, N., Chew, G., Odermatt, A., Fent, K. (2014): Accumulation and effects of the UV-filter octocrylene in adult and embryonic zebrafish (*Danio rerio*). *The Science of the Total Environment* 476-477: 207-217.
10. Bovee, T. F. H., Lommerse, J. P. M., Peijnenburg, A. A. C. M., Fernandes, E. A., Nielen, M. W. F. (2008): A New Highly Androgen Specific Yeast Biosensor, Enabling Optimisation of (Q)SAR Model Approaches. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 108: 121–131.
11. Bruchovsky, N. & Wilson, J. D. (1999): Discovery of the role of dihydrotestosterone in androgen action. *Steroids* 64: 753-759.
12. Burkhardt-Holm, P. (2010): Endocrine disruptors and water quality: A state-of-the-art review. *Water Resources Development* 26(3): 477-493.
14. Buser, H.-R., Balmer, M. E., Schmid, P., Kohler, M. (2006): Occurrence of UV Filters 4-Methylbenzylidene Camphor and Octocrylene in Fish from Various Swiss Rivers with Inputs from Wastewater Treatment Plants. *Environmental Science & Technology* 40(5): 1427-1431.
15. Calafat, A. M., Wong, L.-Y., Ye, X., Reidy, J., Needham, L. L. (2008): Concentrations of the sunscreen agent benzophenone-3 in residents of the United States: National Health and Nutrition Examination Survey 2003--2004. *Environmental Health Perspectives* 116(7): 893-897.
16. Carou, M. E., Ponzo, O. J., Cardozo Gutierrez, R. P., Szwarcfarb, B., Deguiz, M. L., Reynoso, R., Carbone, S., Moguilevsky, J. A., Scacchi, P. (2008): Low dose 4-MBC effect on neuroendocrine regulation of reproductive axis in adult male rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 26(2): 222-224.
17. Carou, M. E., Szwarcfarb, B., Deguiz, M. L., Reynoso, R., Carbone, S., Moguilevsky, J. A., Scacchi, P., Ponzo, O. J. (2009): Impact of 4-methylbenzylidene-camphor (4-mbc) during embryonic and fetal development in the neuroendocrine regulation of testicular axis in prepubertal and peripubertal male rats. *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes* 117(9): 449-454.
18. Chung, Y. W., Nunez, A. A., Clemens, L. G. (2001): Effects of neonatal polychlorinated biphenyl exposure on female sexual behavior. *Physiology & Behavior* 74: 363–370.
19. Close, D. M., Ripp, S., Saylor, G. S. (2009): Reporter proteins in whole-cell optical bioreporter detection systems, biosensor integrations, and biosensing applications. *Sensors* 9: 9147–9174.

20. Cobellis, L., Latini, G., De Felice, C., Razzi, S., Paris, I., Ruggieri, F., Mazzeo, P., Petraglia, F. (2003): High plasma concentrations of di-(2-ethylhexyl)-phthalate in women with endometriosis. *Human Reproduction* 18(7): 1512–1515.
21. Collins, B. M., McLachlan, J. A., Arnold, S. F. (1997): The estrogenic and anti-estrogenic activities of phytochemicals with the human estrogen receptor expressed in yeast. *Steroids* 62: 365–372.
22. Combi, T., Pintado-Herrera, M. G., Lara-Martin, P. A., Miserocchi, S., Langone, L., Guerra, R. (2016): Distribution and fate of legacy and emerging contaminants along the Adriatic Sea: A comparative study. *Environmental Pollution* 218: 1055-1064.
23. Cookman, C. J. & Belcher, S. M. (2014): Classical nuclear hormone receptor activity as a mediator of complex concentration response relationships for endocrine active compounds. *Current Opinion in Pharmacology* 19: 112-119.
24. Coronado, M., De Haro, H., Deng, X., Rempel, M. A., Lavado, R., Schlenk, D. (2008): Estrogenic activity and reproductive effects of the UV-filter oxybenzone (2-hydroxy-4-methoxyphenyl-methanone) in fish. *Aquatic Toxicology* 90(3): 182–187.
25. Coxam, V., Bowman, B. M., Mecham, M., Roth, C. M., Miller, M. A., Miller, S. C. (1996): Effects of dihydrotestosterone alone and combined with estrogen on bone mineral density, bone growth, and formation rates in ovariectomized rats. *Bone* 19(2): 107-114.
26. Cserháti, M., Kriszt, B., Szoboszlay, S., Tóth, Á., Szabó, I., Tánicsics, A., Nagy, I., Horváth, B., Nagy, I., Kukolya, J. (2012): De Novo Genome Project of *Cupriavidus Basilensis* OR16. *Journal of Bacteriology* 194: 2109–2110.
27. Cunha, S. C., Pena, A., Fernandes, J. O. (2015): Dispersive liquid–liquid microextraction followed by microwave-assisted silylation and GC–MS analysis for simultaneous trace quantification of bisphenol A and 13 UV filters in wastewaters. *Journal of Chromatography A* 1414: 10–21.
28. Dang, Z. C., Audinot, V., Papapoulos, S. E., Boutin, J. A., Löwik, C. W. (2003): Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ) as a molecular target for the soy phytoestrogen genistein. *Journal of Biological Chemistry* 278: 962–967.
29. De las Heras, L. F., van der Geize, R., Drzyzga, O., Perera, J., Llorens, J. M. N. (2012): Molecular characterization of three 3-ketosteroid- $\Delta$ 1-dehydrogenase isoenzymes of *Rhodococcus ruber* strain Chol-4. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 132: 271– 281.

30. Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J.-P., Giudice, L. C., Hauser, R., Prins, G. S., Soto, A. M., Zoeller, R. T., Gore, A. C. (2009): Endocrine-Disrupting Chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement. *Endocrine Review* 30(4): 293-342.
31. Downs, C. A., Kramarsky-Winter, E., Segal, R., Fauth, J., Knutson, S., Bronstein, O., Ciner, F. R., Jeger, R., Lichtenfeld, Y., Woodley, C. M., Pennington, P., Cadenas, K., Kushmaro, A., Loya, Y. (2016): Toxicopathological Effects of the Sunscreen UV Filter, Oxybenzone (Benzophenone-3), on Coral Planulae and Cultured Primary Cells and Its Environmental Contamination in Hawaii and the U.S. Virgin Islands. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 70(2): 265-288.
32. Du, Y., Wang, W.-Q., Pei, Z.-T., Ahmad, F., Xu, R.-R., Zhang, Y.-M., Sun, L.-W. (2017): Acute toxicity and ecological risk assessment of benzophenone-3 (BP-3) and benzophenone-4 (BP-4) in ultraviolet (UV)-filters. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 14: 1-15.
33. Ehrig, T., O'Kane, D. J., Prendergast, F. G. (1995): Green-fluorescent protein mutants with altered fluorescence excitation spectra. *FEBS Letters* 367: 163-166.
34. Eldridge, M. L., Sanseverino, J., Layton, A. C., Easter, J. P., Schultz, T. W., Sayler, G. S. (2007): *Saccharomyces cerevisiae* BLYAS, a new bioluminescent bioreporter for detection of androgenic compounds. *Applied and Environmental Microbiology* 73(19), 6012–6018.
35. Emnet, P., Gaw, S., Northcott, G., Storey, B., Graham, L. (2015): Personal care products and steroid hormones in the Antarctic coastal environment associated with two Antarctic research stations, McMurdo Station and Scott Base. *Environmental Research* 136: 331–342.
36. Fent, K., Zenker, A., Rapp, M. (2010): Widespread occurrence of estrogenic UV-filters in aquatic ecosystems in Switzerland. *Environmental Pollution* 158(5): 1817-1824.
37. Fong, H. C. H., Ho, J. C. H., Cheung, A. H. Y., Lai, K. P., Tse, W. K. F. (2016): Developmental toxicity of the common UV filter, benzophenone-2, in zebrafish embryos. *Chemosphere* 164: 413-420.
38. Froehner, K., Meyer, W., Grimme, L. H. (2002): Time-Dependent Toxicity in the Long-Term Inhibition Assay with *Vibrio Fischeri*. *Chemosphere* 46: 987–997.
39. Gago-Ferrero, P., Díaz-Cruz, M. S., Barceló, D. (2011): Fast pressurized liquid extraction with in-cell purification and analysis by liquid chromatography tandem mass spectrometry for the determination of UV filters and their degradation products in sediments. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 400(7): 2195-2204.



40. Gago-Ferrero, P., Díaz-Cruz, M. S., Barceló, D. (2015): UV filters bioaccumulation in fish from Iberian river basins. *The Science of the Total Environment* 518-519: 518-525.
41. Gaido, K. W., Leonard, L. S., Lovell, S., Gould, J. C., Babai, D., Portier, C. J., McDonnell, D. P. (1997): Evaluation of chemicals with endocrine modulating activity in a yeast-based steroid hormone receptor gene transcription assay. *Toxicology and Applied Pharmacology* 143: 205–212.
42. Gaido, K. W., Maness, S. C., McDonnell, D. P., Dehal, S. S., Kupfer, D., Safe, S. (2000): Interaction of methoxychlor and related compounds with estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$ , and androgen receptor: structure-activity studies. *Molecular Pharmaceutics* 58: 852–858.
43. Gao, L., Yuan, T., Zhou, C., Cheng, P., Bai, Q., Ao, J., Wang, W., Zhang, H. (2013): Effects of four commonly used UV filters on the growth, cell viability and oxidative stress responses of the *Tetrahymena thermophila*. *Chemosphere* 93(10): 2507-2513.
44. Gee, J. H. (1983): Ecological implications of buoyancy control in fish. In: Webb, P. W. & Weihs, D. (Eds.), *Fish Biomechanics*. New York, NY, Praeger-Scientific, pp. 140–176.
45. Giokas, D. L., Salvador, A., Chisvert, A. (2007): UV Filters: From Sunscreens to Human Body and the Environment. *Trends in Analytical Chemistry* 26: 360–374.
46. Gonzalez, H., Farbro, A., Larkö, O., Wennberg, A. M. (2006): Percutaneous absorption of the sunscreen benzophenone-3 after repeated whole-body applications, with and without ultraviolet irradiation. *British Journal of Dermatology* 154(2): 337-340.
47. Grino, P. B., Griffin, J. E., Wilson, J. D. (1990): Testosterone at high concentrations interacts with the human androgen receptor similarly to dihydrotestosterone. *Endocrinology* 126: 1165–1172.
48. Groz, M. P., Bueno, M. J. M., Rosain, D., Fenet, H., Casellas, C., Pereira, C., Maria, V., Bebianno, M. J., Gomez, E. (2014): Detection of emerging contaminants (UV filters, UV stabilizers and musks) in marine mussels from Portuguese coast by QuEChERS extraction and GC–MS/MS. *Science of the Total Environment* 493: 162–169.
49. Hagenaaars, A., Vergauwen, L., De Coen, W., Knapen, D. (2011): Structure–activity relationship assessment of four perfluorinated chemicals using a prolonged zebrafish early life stage test. *Chemosphere* 82(5): 764–772.

50. Hastings, J. W., McElroy, W. D., Coulombre, J. (1953): The effect of oxygen upon the immobilization reaction in firefly luminescence. *Journal of Cellular and Comparative Physiology* 42: 137–150.
51. Hauri U, Lütolf B, Hohl C. (2003): Determination of organic sunscreen filters in cosmetics with HPLC/DAD. *Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene* 94(1): 80–92.
52. He, J. H., Gao, J. M., Huang, C. J., Li, C. Q. (2014): Zebrafish models for assessing developmental and reproductive toxicity. *Neurotoxicology and Teratology* 42: 35-42.
53. Henn, K. & Braunbeck, T. (2011): Dechoriation as a tool to improve the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* 153: 91-98.
54. Hever, N. & Belkin, S. (2006): A dual-color bacterial reporter strain for the detection of toxic and genotoxic effects. *Engineering in Life Sciences* 6: 319–323.
55. Hill, A. J., Teraoka, H., Heideman, W., Peterson, R. E. (2005): Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicological Sciences* 86(1): 6-19.
56. Ho, S. M., Tang, W. Y., Belmonte de Frausto, J., Prins, G. S. (2006): Developmental exposure to estradiol and bisphenol A increases susceptibility to prostate carcinogenesis and epigenetically regulates phosphodiesterase type 4 variant 4. *Cancer Research* 66: 5624–5632.
57. Huang, H., Huang, C., Wang, L., Ye, X., Bai, C., Simonich, M. T., Tanguay, R. L., Dong, Q. (2010): Toxicity, uptake kinetics and behavior assessment in zebrafish embryos following exposure to perfluorooctanesulphonic acid (PFOS). *Aquatic Toxicology* 98(2): 139–147.
58. Incardona, J. P., Collier, T. K., Scholz, N. L. (2004): Defects in cardiac function precede morphological abnormalities in fish embryos exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicology and Applied Pharmacology* 196(2): 191–205.
59. Itagaki, E., Hatta, T., Wakabayashi, T., Suzuki, K. (1990): Spectral properties of 3-ketosteroid  $\Delta^1$ -dehydrogenase from *Nocardia corallina*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1040: 281–286.
60. Jeon, H.-K., Chung, Y., Ryu, J.-C. (2006): Simultaneous determination of benzophenone-type UV filters in water and soil by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1131(1-2): 192-202.
61. Kaiser, D., Sieratowicz, A., Zielke, H., Oetken, M., Hollert, H., Oehlmann, J. (2012): Ecotoxicological effect characterisation of widely used organic UV filters. *Environmental Pollution* 163: 84-90.

62. Kameda, Y., Kimura, K., Miyazaki, M. (2011): Occurrence and profiles of organic sun-blocking agents in surface waters and sediments in Japanese rivers and lakes. *Environmental Pollution* 159(6): 1570-1576.
63. Kelce, W. R., Stone, C. R., Laws, S. C., Gray, L. E., Kemppainen, J. A., Wilson, E. M. (1995): Persistent DDT metabolite *p,p'*-DDE is a potent androgen receptor antagonist. *Nature* 375: 581–585.
64. Kim, Y. U., Han, J., Sang, S. L., Shimizu, K., Tsutsumi, Y., Kondo, R. (2007): Steroid 9 $\alpha$ -hydroxylation during testosterone degradation by resting *Rhodococcus equi* cells. *Archiv der Pharmazie – Chemistry in Life Sciences* 340(4): 209-214.
65. Kim, S. & Choi, K. (2014): Occurrences, toxicities, and ecological risks of benzophenone-3, a common component of organic sunscreen products: A mini-review. *Environment International* 70: 143-157.
66. Kisiela, M., Skarka, A., Ebert, B., Maser, E. (2012): Hydroxysteroid dehydrogenases (HSDs) in bacteria – A bioinformatic perspective. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 129: 31– 46.
67. Kitamura, S., Jinno, N., Ohta, S., Kuroki, H., Fujimoto, N. (2002): Thyroid hormonal activity of the flame retardants tetrabromobisphenol A and tetrachlorobisphenol A. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 293: 554–559.
68. Klann, A., Levy, G., Lutz, I., Müller, C., Kloas, W., Hildebrandt, J. P. (2005): Estrogen-like effects of ultraviolet screen 3-(4-methylbenzylidene)-camphor (Eusolex 6300) on cell proliferation and gene induction in mammalian and amphibian cells. *Environmental Research* 97(3): 274-281.
69. Knol, J., Bodewits, K., Hessels, G. I., Dijkhuizen, L., van der Geize, R. (2008): 3-Keto-5 $\alpha$ -steroid  $\Delta$ 1-dehydrogenase from *Rhodococcus erythropolis* SQ1 and its orthologue in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv are highly specific enzymes that function in cholesterol catabolism. *Biochemical Journal* 410(2): 339–346.
70. Krifaton, Cs., Kriszt, B., Risa, A., Szoboszlay, S., Cserhádi, M., Harkai, P., Eldridge, M., Wang, J., Kukolya, J. (2013): Application of a Yeast Estrogen Reporter System for Screening Zearalenone Degrading Microbes. *Journal of hazardous materials* 244-245: 429–435.
71. Kriszt B., Tánicsics A., Cserhádi M., Tóth Á., Nagy I., Horváth B., Nagy I., Tamura, T., Kukolya J., Szoboszlay S. (2012): *De Novo* Genome Project for the Aromatic Degrader *Rhodococcus pyridinivorans* Strain AK37. *Journal of Bacteriology* 194(5): 1247.

72. Kunisue, T., Chen, Z., Louis, G. M. B., Sundaram, R., Hediger, M. L., Sun, L., Kannan, K. (2012): Urinary Concentrations of Benzophenone-type UV Filters in U.S. Women and Their Association with Endometriosis. *Environmental Science & Technology* 46(8): 4624-4632.
73. Kunz, P. Y. & Fent, K. (2006): Multiple hormonal activities of UV filters and comparison of *in vivo* and *in vitro* estrogenic activity of ethyl-4-aminobenzoate in fish. *Aquatic Toxicology* 79: 305–324.
74. Kunz, P. Y., Galicia, H. F., Fent, K. (2006): Comparison of *in vitro* and *in vivo* estrogenic activity of UV filters in fish. *Toxicological Sciences* 90: 349–361.
75. Kupper, T., Plagellat, C., Brändli, R. C., de Alencastro, L. F., Grandjean, D., Tarradellas, J. (2006): Fate and removal of polycyclic musks, UV filters and biocides during wastewater treatment. *Water Research* 40: 2603–2612.
76. Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-685.
77. Langford, K. H., Reid, M. J., Fjeld, E., Øxnevad, S., Thomas, K. V. (2015): Environmental occurrence and risk of organic UV filters and stabilizers in multiple matrices in Norway. *Environment International* 80: 1–7.
78. Larkin, M. J., Kulakov, L. A., Allen, C. C. R. (2005): Biodegradation and *Rhodococcus* – masters of catabolic versatility. *Current Opinion in Biotechnology* 16: 282-290.
79. Leav, I., Ho, S.-M., Ofner, P., Merk, F. B., Kwan, P. W.-L., Damassa, D. (1988): Biochemical alterations in sex hormone-induced hyperplasia and dysplasia of the dorsolateral prostates of Noble rats. *Journal of The National Cancer Institute* 80(13): 1045-1053.
80. Lee, H. J., Chattopadhyay, S., Gong, E. Y., Ahn, R. S., Lee, K. (2003): Antiandrogenic effects of bisphenol A and nonylphenol on the function of androgen receptor. *Toxicological Sciences* 75: 40–46.
81. Lenard, J. (1992): Mammalian Hormones in Microbial Cells. *Trends in Biochemical Sciences* 17: 147–150.
82. Leskinen, P., Hilscherova, K., Sidlova, T., Kiviranta, H., Pessala, P., Salo, S., Verta, M., Virta, M. (2008): Detecting AhR ligands in sediments using bioluminescent reporter yeast. *Biosensors and Bioelectronics* 23: 1850-1855.
83. Lewis, K. E. & Eisen, J. S. (2003): From cells to circuits: development of the zebrafish spinal cord. *Progress in Neurobiology* 69: 419–449.

84. Li, M.-H. (2012): Acute toxicity of benzophenone-type UV filters and paraben preservatives to freshwater planarian, *Dugesia japonica*. *Toxicological and Environmental Chemistry* 94(3): 566-573.
85. Lindsey, B. W., Smith, F. M., Croll, R. P. (2010): From inflation to flotation: contribution of the swimbladder to whole-body density and swimming depth during development of the zebrafish (*Danio rerio*). *Zebrafish* 7: 85–96.
86. Liu, Z., Kanjo, Y., Mizutani, S. (2009): Urinary excretion rates of natural estrogens and androgens from humans, and their occurrence and fate in the environment: A review. *Science of the Total Environment* 407: 4975-4985.
87. Liu, S., Ying, G.-G., Zhao, J.-L., Chen, F., Yang, B., Zhou, L.-J., Lai, H. (2011): Trace analysis of 28 steroids in surface water, wastewater and sludge samples by rapid resolution liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1218: 1367-1378.
88. Liu, H., Sun, P., Liu, H., Yang, S., Wang, L., Wang, Z. (2015a): Acute toxicity of benzophenone-type UV filters for *Photobacterium phosphoreum* and *Daphnia magna*: QSAR analysis, interspecies relationship and integrated assessment. *Chemosphere* 135: 182-188.
89. Liu, H., Sun, P., Liu, H., Yang, S., Wang, L., Wang, Z. (2015b): Hepatic oxidative stress biomarker responses in freshwater fish *Carassius auratus* exposed to four benzophenone UV filters. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 119: 116-122.
90. Loraine, G. A. & Pettigrove, M. E. (2006): Seasonal Variations in Concentrations of Pharmaceuticals and Personal Care Products in Drinking Water and Reclaimed Wastewater in Southern California. *Environmental Science & Technology* 40(3): 687-695.
91. Ma, R., Cotton, B., Lichtensteiger, W., Schlumpf, M. (2003): UV filters with antagonistic action at androgen receptors in the MDA-kb2 cell transcriptional-activation assay. *Toxicological Sciences* 74(1): 43–50.
92. Madigan, M. T. et al. (2012). Brock biology of microorganisms (Thirteenth edition). Boston: Pearson. p. 1043.
93. Mathieu, J. M., Mohn, W. W., Eltis, L. D., LeBlanc, J. C., Stewart, G. R., Dresen, C. Okamoto, K., Alvarez, P. J. (2010): 7-Ketocholesterol catabolism by *Rhodococcus jostii* RHA1. *Applied and Environment Microbiology* 76(1): 352–355.
94. McCollum, C. W., Ducharme, N. A., Bondesson, M., Gustafsson, J. A. (2011): Developmental toxicity screening in zebrafish. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today* 93(2): 67–114.

95. McDonald, P. G. & Doughty, C. (1972): Comparison of the effect of neonatal administration of testosterone and dihydrotestosterone in the female rat. *Journal of Reproduction and Fertility* 30: 55-62.
96. McElroy, W. D. & Rainwater, C. S. (1948): Spectral energy distribution of the light emitted by firefly extracts. *Journal of Cellular and Comparative Physiology* 32: 421–425.
97. McLeod, M. P., Warren, R. L., Hsiao, W. W., Araki, N., Myhre, M., Fernandes, C., Miyazawa, D., Wong, W., Lillquist, A. L., Wang, D., Dosanjh, M., Hara, H., Petrescu, A., Morin, R. D., Yang, G., Stott, J. M., Schein, J. E., Shin, H., Smailus, D., Siddiqui, A. S., Marra, M. A., Jones, S. J. M., Holt, R., Brinkman, F. S. L., Miyauchi, K., Fukuda, M., Davies, J. E., Mohn, W. W., Eltis, L. D. (2006) : The complete genome of *Rhodococcus sp.* RHA1 provides insights into a catabolic powerhouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(42): 15582-15587.
98. Meeker, J. D., Ryan, L., Barr, D. B., Herrick, R. F., Bennett, D. H., Bravo, R., Hauser, R. (2004): The relationship of urinary metabolites of carbaryl/naphthalene and chlorpyrifos with human semen quality. *Environmental Health Perspectives* 112: 1665– 1670.
99. Meighen, E. A. (1991): Molecular biology of bacterial bioluminescence. *Microbiological reviews* 55(1): 123-142.
100. Meighen, E. A. (1994): Genetics of bacterial bioluminescence. *Annual Review of Genetics* 28: 117-139.
101. Mocarelli, P., Gerthoux, P. M., Patterson Jr, D. G., Milani, S., Limonta, G., Bertona, M., Signorini, S., Tramacere, P., Colombo, L., Crespi, C., Brambilla, P., Sarto, C., Carreri, V., Sampson, E. J., Turner, W. E., Needham, L. L. (2008): Dioxin exposure, from infancy through puberty, produces endocrine disruption and affects human semen quality. *Environmental Health Perspectives* 116: 70–77.
102. Modugno, F., Weissfeld, J. L., Trump, D. L., Zmuda, J. M., Shea, P., Cauley, J. A., Ferrell, R. E. (2001): Allelic variants of aromatase and the androgen and estrogen receptors: toward a multigenic model of prostate cancer risk. *Clinical Cancer Research* 7: 3092–3096.
103. Moens, C. B. & Prince, V. E. (2002): Constructing the hindbrain: insights from the zebrafish. *Developmental Dynamics* 224: 1–17.
104. Molins-Delgado, D., Mánez, M., Andreu, A., Hiraldo, F., Eljarrat, E., Barceló, D., Díaz-Cruz, M. S. (2017): A Potential New Threat to Wild Life: Presence of UV Filters

- in Bird Eggs from a Preserved Area. *Environmental Science and Technology* 51(19): 10983-10990.
105. Molnár, I., Choi, K. P., Yamashita, M., Murooka, Y. (1995): Molecular cloning, expression in *Streptomyces lividans*, and analysis of a gene cluster from *Arthrobacter simplex* encoding 3-ketosteroid- $\Delta$ 1-dehydrogenase, 3-ketosteroid- $\Delta$ 5-isomerase and a hypothetical regulatory protein. *Molecular Microbiology* 15(5): 895–905.
  106. Morii, S., Fujii, C., Miyoshi, T., Iwami, M., Itagaki, E. (1998): 3-Ketosteroid - $\Delta$ 1-dehydrogenase of *Rhodococcus rhodochrous*: sequencing of the genomic DNA and hyperexpression, purification, and characterization of the recombinant enzyme. *Journal of Biochemistry* 124: 1026–1032.
  107. Moriyama, K., Tagami, T., Akamizu, T., Usui, T., Saijo, M., Kanamoto, N., Hataya, Y., Shimatsu, A., Kuzuya, H., Nakao, K. (2002): Thyroid hormone action is disrupted by bisphenol A as an antagonist. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 87: 5185–5190.
  108. Nashev, L. G., Schuster, D., Laggner, C., Sodha, S., Langer, T., Wolber, G., Odermatt, A. (2010): The UV-filter benzophenone-1 inhibits 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 3: virtual screening as a strategy to identify potential endocrine disrupting chemicals. *Biochemical Pharmacology* 79(8): 1189–1199.
  109. Newbold, R. R., Moore, A. B., Dixon, D. (2002): Characterization of uterine leiomyomas in CD-1 mice following developmental exposure to diethylstilbestrol (DES). *Toxicologic Pathology* 30: 611–616.
  110. Newbold, R. R., Padilla-Banks, E., Snyder, R. J., Jefferson, W. N. (2007): Perinatal exposure to environmental estrogens and the development of obesity. *Molecular Nutrition & Food Research* 51: 912–917.
  111. Nijvipakul, S., Wongratana, J., Suadee, C., Entsch, B., Ballou, D.P., Chaiyen, P. (2008): LuxG is a functioning flavin reductase for bacterial luminescence. *Journal of Bacteriology* 190(5): 1531–1538.
  112. Ozáez, I., Martínez-Guitarte, J. L., Morcillo, G. (2014): The UV filter benzophenone 3 (BP-3) activates hormonal genes mimicking the action of ecdysone and alters embryo development in the insect *Chironomus riparius* (Diptera). *Environmental Pollution* 192: 19-26.
  113. Palmer, J. R., Wise, L. A., Hatch, E. E., Troisi, R., Titus-Ernstoff, L., Strohsnitter, W., Kaufman, R., Herbst, A. L., Noller, K. L., Hyer, M., Hoover, R. N. (2006): Prenatal diethylstilbestrol exposure and risk of breast cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 15(8): 1509–1514.

114. Paredes, E., Perez, S., Rodil, R., Quintana, J. B., Beiras, R. (2014): Ecotoxicological evaluation of four UV filters using marine organisms from different trophic levels *Isochrysis galbana*, *Mytilus galloprovincialis*, *Paracentrotus lividus*, and *Siriella armata*. *Chemosphere* 104: 44-50.
115. Park, C.-B., Jang, J., Kim, S., Kim, Y. J. (2017): Single- and mixture toxicity of three organic UV-filters, ethylhexyl methoxycinnamate, octocrylene, and avobenzone on *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 137: 57-63.
116. Parvez, S., Venkataraman, C., Mukherji, S. (2006): A review on advantages of implementing luminescence inhibition test (*Vibrio fischeri*) for acute toxicity prediction of chemicals. *Environment International* 32(2): 265-268.
117. Petrusma, M., Dijkhuizen L., Van Der Geize, R. (2009): *Rhodococcus rhodochrous* DSM 43269 3-Ketosteroid 9 $\alpha$ -Hydroxylase, a Two-Component Iron-Sulfur-Containing Monooxygenase with Subtle Steroid Substrate Specificity. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 5300–5307.
118. Petrusma, M., Hessels, G., Dijkhuizen, L., Van Der Geize, R. (2011): Multiplicity of 3-Ketosteroid-9 $\alpha$ -Hydroxylase Enzymes in *Rhodococcus rhodochrous* DSM43269 for Specific Degradation of Different Classes of Steroids. *Journal of Bacteriology* 193(15): 3931-3940.
119. Plagellat, C., Kupper, T., Furrer, R., de Alencastro, L. F., Grandjean, D., Tarradellas, J. (2006): Concentrations and specific loads of UV filters in sewage sludge originating from a monitoring network in Switzerland. *Chemosphere* 62: 915–925.
120. Plotkin, B. J., Roose, R. J., Erikson, Q., Viselli, S. M. (2003): Effect of androgens and glucocorticoids on microbial growth and antimicrobial susceptibility. *Current Microbiology* 47: 514-520.
121. Poiger, T., Buser, H.-R., Balmer, M. E., Bergqvist, P.-A., Muller, M. D. (2004): Occurrence of UV filter compounds from sunscreens in surface waters: regional mass balance in two Swiss lakes. *Chemosphere* 55: 951–963.
122. Prem, C., Salvenmoser, W., Würtz, J., Peleser, B. (2000): Swim bladder gas gland cells produce surfactant: *in vivo* and in culture. *The American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 279: 2336–2343.
123. Prince, M. M., Ruder, A. M., Hein, M. J., Waters, M. A., Whelan, E. A., Nilsen, N., Ward, E. M., Schnorr, T. M., Laber, P. A., Davis-King, K. E. (2006): Mortality and exposure response among 14,458 electrical capacitor manufacturing workers exposed to polychlorinated biphenyls (PCBs). *Environmental Health Perspectives* 114: 1508–1514.



124. Prins, G. S., Tang, W. Y., Belmonte, J., Ho, S. M. (2008): Perinatal exposure to oestradiol and bisphenol A alters the prostate epigenome and increases susceptibility to carcinogenesis. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 102: 134–138.
125. Ramos, S., Homem, V., Alves, A., Santos, L. (2016): A review of organic UV-filters in wastewater treatment plants. *Environment International* 86: 24-44.
126. Rasier, G., Parent, A. S., Gérard, A., Denooz, R., Lebrethon, M. C., Charlier, C., Bourguignon, J. P. (2008): Mechanisms of interaction of endocrine-disrupting chemicals with glutamate-evoked secretion of gonadotropin-releasing hormone. *Toxicological Sciences* 102(1): 33–41.
127. Renier, C., Faraco, J. H., Bourgin, P., Motley, T., Bonaventure, P., Rosa, F., Mignot, E. (2007): Genomic and functional conservation of sedative–hypnotic targets in the zebrafish. *Pharmacogenetics and Genomics* 17: 237–253.
128. Riley, L. G., Hirano, T., Grau, E. G. (2004): Estradiol-17 $\beta$  and dihydrotestosterone differentially regulate vitellogenin and insulin-like growth factor-I production in primary hepatocytes of the tilapia *Oreochromis mossambicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 138: 177-186.
129. Rodil, R. & Moeder, M. (2008): Development of a method for the determination of UV filters in water samples using stir bar sorptive extraction and thermal desorption–gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of chromatography A* 1179(2): 81-88.
130. Routledge, E. J. & Sumpter, J. P. (1996): Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environmental Toxicology and Chemistry* 15(3): 241–248.
131. Rowland, S. S., Falkler Jr., W. A., Bashirelahi, N. (1992): Identification of an estrogen-binding protein in *Pseudomonas aeruginosa*. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 42(7): 721-727.
132. Rónai A. (2004): A farmakodinámia alapjai. In: Fürst Zs. (szerk.): Farmakológia. Medicina Könyvkiadó RT. Budapest, 2004 pp: 38-81.
133. Ruszkiewicz, J. A., Pinkas, A., Ferrer, B., Peres, T. V., Tsatsakis, A., Aschner, M. (2017): Neurotoxic effect of active ingredients in sunscreen products, a contemporary review. *Toxicology Reports* 4: 245-259.
134. Sano, K., Inohaya, K., Kawaguchi, M., Yoshizaki, N., Iuchi, I., Yasumasu, S. (2008): Purification and characterization of zebrafish hatching enzyme - An evolutionary aspect of the mechanism of egg envelope digestion. *FEBS Journal* 275(23): 5934-5946.

135. Sanseverino, J., Gupta, R. K., Layton, A. C., Patterson, S. S., Ripp, S. A., Saidak, L., Simpson, L., Schultz, T. W., Sayler, G. S., Simpson, M. L. (2005): Use of *Saccharomyces cerevisiae* BLYES Expressing Bacterial Bioluminescence for Rapid, Sensitive Detection of Estrogenic Compounds. *Applied and Environmental Microbiology* 71(8): 4455-4460.
136. Sanseverino, J., Eldridge, M. L., Layton, A. C., Easter, J. P., Yarbrough, J., Schultz, T. W., Sayler, G. S. (2009): Screening of Potentially Hormonally Active Chemicals using Bioluminescent Yeast Bioreporters. *Toxicological Sciences* 107(1): 122-134.
137. Santos, A. J. M., Miranda, M. S., Esteves da Silva, J. C. G. (2012): The degradation products of UV filters in aqueous and chlorinated aqueous solutions. *Water research* 46(10): 3167-3176.
138. Schlecht, C., Klammer, H., Jarry, H., Wuttke, W. (2004): Effects of estradiol, benzophenone-2 and benzophenone-3 on the expression pattern of the estrogen receptors (ER) alpha and beta, the estrogen receptor-related receptor 1 (ERR1) and the aryl hydrocarbon receptor (AhR) in adult ovariectomized rats. *Toxicology* 205(1-2): 123-130.
139. Schlumpf, M., Cotton, B., Conscience, M., Haller, V., Steinmann, B., Lichtensteiger, W. (2001): *In Vitro* and *in Vivo* Estrogenicity of UV Screens. *Environmental Health Perspectives* 109(3): 239-244.
140. Schlumpf, M., Kypke, K., Wittassek, M., Angerer, J., Mascher, H., Mascher, D., Vökt, C., Birchler, M., Lichtensteiger, W. (2010): Exposure patterns of UV filters, fragrances, parabens, phthalates, organochlor pesticides, PBDEs, and PCBs in human milk: correlation of UV filters with use of cosmetics. *Chemosphere* 81(10): 1171-1183.
141. Schmitt, C., Oetken, M., Dittberner, O., Wagner, M., Oehlmann, J. (2008): Endocrine modulation and toxic effects of two commonly used UV screens on the aquatic invertebrates *Potamopyrgus antipodarum* and *Lumbriculus variegatus*. *Environmental Pollution* 152(2): 322–329.
142. Schreurs, R., Sonneveld, E., Jansen, J. H., Seinen, W., van der Burg, B. (2005): Interaction of polycyclic musks and UV filters with the estrogen receptor (ER), androgen receptor (AR), and progesterone receptor (PR) in reporter gene bioassays. *Toxicological Sciences* 83(2): 264–272.
143. Schultis, T. & Metzger, J. W. (2004): Determination of estrogenic activity by LYES-assay (yeast estrogen screen-assay assisted by enzymatic digestion with lyticase). *Chemosphere* 57: 1649-1655.

144. Seidlová-Wuttke, D., Jarry, H., Christoffel, J., Rimoldi, G., Wuttke, W. (2006): Comparison of effects of estradiol (E2) with those of octylmethoxycinnamate (OMC) and 4-methylbenzylidene camphor (4MBC)--2 filters of UV light - on several uterine, vaginal and bone parameters. *Toxicology and Applied Pharmacology* 210(3): 246-254.
145. Seliger, H. H. & McElroy, W. D. (1964): The colors of firefly bioluminescence: enzyme configuration and species specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 52: 75–81.
146. Shaner, N. C., Steinbach, P. A., Tsien, R. Y. (2005): A guide to choosing fluorescent proteins. *Nature Methods* 2: 905–909.
147. Shilling, A. D. & Williams, D. E. (2000): The non-aromatizable androgen, dihydrotestosterone, induces antiestrogenic responses in the rainbow trout. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 74: 187-194.
148. Sieratowicz, A., Kaiser, D., Behr, M., Oetken, M., Oehlmann, J. (2011): Acute and chronic toxicity of four frequently used UV filter substances for *Desmodesmus subspicatus* and *Daphnia magna*. *Journal of Environmental Science and Health, Part A* 46(12): 1311-1319.
149. Sirotkin, A. V. & Harrath, A. H. (2014): Phytoestrogens and their effects. *European Journal of Pharmacology* 741: 230-236.
150. Skidmore, J. F. (1965): Resistance to zinc sulphate of the zebrafish (*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan) at different phases of its life history. *Annals of Applied Biology* 56: 47–53.
151. Sobek, A., Bejgarn, S., Rudén, C., Molander, L., Breitholtz, M. (2013): In the shadow of the Cosmetic Directive — Inconsistencies in EU environmental hazard classification requirements for UV-filter. *Science of the Total Environment* 461-462: 706-711.
152. Sohoni, P. & Sumpter, J. P. (1998): Several environmental oestrogens are also anti-androgens. *Journal of Endocrinology* 158: 327–339.
153. Steyn, P. S. (1995): Mycotoxins, general view, chemistry and structure. *Toxicology Letters* 82-83: 843-851.
154. Suzuki, T., Kitamura, S., Khota, R., Sugihara, K., Fujimoto, N., Ohta, S. (2005): Estrogenic and antiandrogenic activities of 17 benzophenone derivatives used as UV stabilizers and sunscreens. *Toxicology and Applied Pharmacology* 203(1): 9-17.
155. Takeuchi, T., Tsutsumi, O., Ikezuki, Y., Takai, Y., Taketani, Y. (2004): Positive Relationship Between Androgen And The Endocrine Disruptor, Bisphenol A, In

- Normal Women And Women With Ovarian Dysfunction. *Endocrine Journal* 51(2): 165-169.
156. Tarazona, I., Chisvert, A., León, Z., Salvador, A. (2010): Determination of hydroxylated benzophenone UV filters in sea water samples by dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1217(29): 4771-4778.
  157. Tauriainen, S., Karp, M., Chang, W., Virta, M. (1998): Luminescent bacterial sensor for cadmium and lead. *Biosensors and Bioelectronics* 13: 931-938.
  158. Taylor, C. J., Bain, L. A., Richardson, D. J., Spiro, S., Russel, D. A. (2004): Construction of a whole-cell gene reporter for the fluorescent bioassay of nitrate. *Analytical Biochemistry* 328: 60-66.
  159. Teraoka, H., Dong, W., Ogawa, S., Tsukiyama, S., Okuhara, Y., Niiyama, M., Ueno, N., Peterson, R. E., Hiraga, T. (2002): 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin toxicity in the zebrafish embryo: Altered regional blood flow and impaired lower jaw development. *Toxicological Sciences* 65(2): 192-199.
  160. Thomas, J. A. & Keenan, E. J. (1994): Effects of estrogens on the prostate. *Journal of Andrology* 15: 97-99.
  161. Tsui, M. M. P., Leung, H. W., Lam, P. K. S. Murphy, M. B. (2014): Seasonal occurrence, removal efficiencies and preliminary risk assessment of multiple classes of organic UV filters in wastewater treatment plants. *Water research* 53: 58-67.
  162. Turgeon, J. L. & Waring, D. W. (1999): Androgen modulation of luteinizing hormone secretion by female rat gonadotropes. *Endocrinology* 140(4): 1767-1774.
  163. Urbach, F. (2001): The historical aspects of sunscreens. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 64: 99-104.
  164. Usenko, C. Y., Harper, S. L., Tanguay, R. L. (2007): *In vivo* evaluation of carbon fullerene toxicity using embryonic zebrafish. *Carbon* 45: 1891-1898.
  165. U.S. EPA. (1997): Special Report on Environmental Endocrine Disruption: An Effects Assessment and Analysis. U.S. Environmental Protection Agency, Risk Assessment Forum, Washington, DC, 630/R-96/012
  166. Valle-Sistac, J., Molins-Delgado, D., Díaz, M., Ibáñez, L., Barceló, D., Díaz-Cruz, S. M. (2016): Determination of parabens and benzophenone-type UV filters in human placenta. First description of the existence of benzyl paraben and benzophenone-4. *Environment International* 88: 243-249.
  167. Vandenberg, L. N., Colborn, T., Hayes, T. B., Heindel, J. J., Jacobs, D. R., Lee, D.-H., Shioda, T., Soto, A. M., vom Saal, F. S., Welshons, W. V., Zoeller, R. T., Myers, J. P.

- (2012): Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocrine Reviews* 33(3): 378-455.
168. Van der Geize, R., Hessels, G. I., Van Gerwen, R., Van der Meijden, P., Dijkhuizen, L. (2002): Molecular and functional characterization of *kshA* and *kshB*, encoding two components of 3-ketosteroid 9 $\alpha$ -hydroxylase, a class IA monooxygenase, in *Rhodococcus erythropolis* strain SQ1. *Molecular Microbiology* 45: 1007–1018.
169. Van der Geize, R., Yam, K., Heuser, T., Wilbrink, M. H., Hara, H., Anderton, M. C., Sim, E., Dijkhuizen, L., Davies, J. E., Mohn, W. W., Eltis, L. D. (2007): A gene cluster encoding cholesterol catabolism in a soil actinomycete provides insight into *Mycobacterium tuberculosis* survival in macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(6): 1947-1952.
170. Whitten, P. L., Lewis, C., Russell, E., Naftolin, F. (1995): Phytoestrogen influences on the development of behavior and gonadotropin function. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 208: 82–86.
171. Wilbrink, M. H., Petrusma, M., Dijkhuizen, L., van der Geize, R. (2011): FadD19 of *Rhodococcus rhodochrous* DSM43269, a steroid-coenzyme A ligase essential for degradation of C-24 branched sterol side chains. *Applied and Environmental Microbiology* 77: 4455–4464.
172. Wilson, S. W., Brand, M., Eisen, J. S. (2002): Patterning the zebrafish central nervous system. *Results and Problems in Cell Differentiation* 40: 181–215.
173. Wovcha, M. G., Brooks, K. E., Kominek, L. A. (1979): Evidence for two steroid 1,2-dehydrogenase activities in *Mycobacterium fortuitum*. *Biochimica et Biophysica Acta* 574(3): 471–479.
174. Xu, T., Close, D. M., Sayler, G. S., Ripp, S. (2013): Genetically modified whole-cell bioreporters for environmental assessment. *Ecological Indicators* 28: 125-141.
175. Yang, X., Xue, R., Shen, C., Li, S., Gao, C., Wang, Q., Zhao, X. (2011): Genome sequence of *Rhodococcus sp.* strain R04, a polychlorinated-biphenyl biodegrader. *Journal of Bacteriology* 193: 5032-5033.
176. Zhang, Q., Ma, X., Dzakpasu, M., Wang, X. C. (2017): Evaluation of ecotoxicological effects of benzophenone UV filters: Luminescent bacteria toxicity, genotoxicity and hormonal activity. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 142: 338-347.
177. Zhuang, R., Žabar, R., Grbović, G., Dolenc, D., Yao, J., Tižler, T., Trebže, P. (2013): Stability and toxicity of selected chlorinated benzophenone-type uv filters in waters. *Acta Chimica Slovenica* 60: 826-832.

178. Zucchi, S., Oggier, D. M., Fent, K. (2011): Global gene expression profile induced by the UV-filter 2-ethyl-hexyl-4-trimethoxycinnamate (EHMC) in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Pollution* 159: 3086-3096.

#### **Internetes hivatkozások:**

1. http1:  
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/cerillian/d073?lang=hu&region=HU>  
(Letöltve: 2017.05.17)
2. http2: [http://www.genome.jp/kegg-bin/show\\_pathway?ko00140](http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?ko00140) (Letöltve: 2016-06-27)
3. http3:  
<http://ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing/index.cfm?fuseaction=search.results>  
(Letöltve: 2018-09-24)
4. http4: <https://monographs.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/06/mono101-007.pdf>  
(Letöltve: 2018-09-24)
5. http5: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/67005290> (Letöltve: 2017.05.17.)
6. http6: <https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/5515/1> (Letöltve: 2018-09-25)
7. http7: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/59647?lang=hu&region=HU>  
(Letöltve: 2017.05.17)
8. http8: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/67038939> (Letöltve: 2017.05.17.)
9. http9: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68002164> (Letöltve: 2017.05.17.)
10. http10: <https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/25426> (Letöltve: 2018.09.25.)
11. http11:  
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/78551?lang=hu&region=HU>  
(Letöltve: 2017.05.17.)
12. http12: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/67118580> (Letöltve: 2017.05.17.)
13. http13: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68002934> (Letöltve: 2017.05.17.)
14. http14: <https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/15876/1>  
(Letöltve: 2018.09.25.)
15. http15: [https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/structure4/048/mfcd00072582.eps/\\_jcr\\_content/renditions/mfcd00072582-large.png](https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/structure4/048/mfcd00072582.eps/_jcr_content/renditions/mfcd00072582-large.png) (Letöltve: 2018.02.01.)
16. http16: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/67088673> (Letöltve: 2017.05.17.)

17. [http17: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68000179](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68000179) (Letöltve: 2017.05.17.)
18. [http18: https://echa.europa.eu/hu/registration-dossier/-/registered-dossier/14858/1](https://echa.europa.eu/hu/registration-dossier/-/registered-dossier/14858/1)  
(Letöltve: 2018.09.25.)
19. [http19: http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/02343?lang=hu&region=HU&gclid=CNjr-o7T9tMCFdW7GwodlZ8B2A](http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/02343?lang=hu&region=HU&gclid=CNjr-o7T9tMCFdW7GwodlZ8B2A) (Letöltve: 2017.05.17.)
20. [http20: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=1298605&lvl=3&p=has\\_linkout&p=blast\\_url&p=genome\\_blast&p=mapview&keep=1&src\\_hmode=1&unlock&lin=s&log\\_op=lineage\\_toggle](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=1298605&lvl=3&p=has_linkout&p=blast_url&p=genome_blast&p=mapview&keep=1&src_hmode=1&unlock&lin=s&log_op=lineage_toggle) (Letöltve: 2017.06.10.)
21. [http21: http://apps.echa.europa.eu/registered/data/dossiers/DISS-dffb4072-e3ba-47ae-e044-00144f67d031/AGGR-933623f0-9703-47f6-918e-5a4b1d7552a7\\_DISS-dffb4072-e3ba-47ae-e044-00144f67d031.html#AGGR-933623f0-9703-47f6-918e-5a4b1d7552a7](http://apps.echa.europa.eu/registered/data/dossiers/DISS-dffb4072-e3ba-47ae-e044-00144f67d031/AGGR-933623f0-9703-47f6-918e-5a4b1d7552a7_DISS-dffb4072-e3ba-47ae-e044-00144f67d031.html#AGGR-933623f0-9703-47f6-918e-5a4b1d7552a7), (Letöltve: 2015.06.23.)

#### **Egyéb hivatkozások:**

1. Az Európai Parlament és a Tanács 1223/2009/EK rendelete (2009. november 30.) a kozmetikai termékekről
2. Az Európai Parlament és a Tanács 1272/2008/EK rendelete (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
3. A BIZOTTSÁG 866/2014/EU RENDELETE kozmetikai termékekről szóló 1223/2009/EK európai parlamenti és tanácsi rendelet III., V. és VI. mellékletének módosításáról (2014. augusztus 8.)
4. A BIZOTTSÁG (EU) 2015/1298 RENDELETE a kozmetikai termékekről szóló 1223/2009/EK európai parlamenti és tanácsi rendelet II. és VI. mellékletének módosításáról (2015. július 28.)
5. A BIZOTTSÁG (EU) 2016/621 RENDELETE a kozmetikai termékekről szóló 1223/2009/EK európai parlamenti és tanácsi rendelet VI. mellékletének módosításáról (2016. április 21.)
6. A BIZOTTSÁG (EU) 2016/1143 RENDELETE a kozmetikai termékekről szóló 1223/2009/EK európai parlamenti és tanácsi rendelet VI. mellékletének módosításáról (2016. július 13.)

7. ECHA (European Chemicals Agency) (2015). Guidance on the application of the CLP criteria. Guidance to Regulation (EC) No. 1272/2008 on classification, labelling and packaging (CLP) of substances and mixtures. Part 4 Environ Hazards 2015: 45-47.
8. Az Európai Parlament és a Tanács 1907/2006/EK rendelete (2006. december 18.) a vegyi anyagok regisztrálásáról, értékeléséről, engedélyezéséről és korlátozásáról (REACH), az Európai Vegyianyag-ügynökség létrehozásáról, az 1999/45/EK irányelv módosításáról, valamint a 793/93/EGK tanácsi rendelet, az 1488/94/EK bizottsági rendelet, a 76/769/EGK tanácsi irányelv, a 91/155/EGK, a 93/67/EGK, a 93/105/EK és a 2000/21/EK bizottsági irányelv hatályon kívül helyezéséről
9. MSZ EN ISO 11348-1:2009 Vízhőminőség. Vízminták gátló hatásának meghatározása a *Vibrio fischeri* fénykibocsátására (lumineszcensbaktérium-teszt). 1. rész: Vizsgálat frissen előkészített baktériumokkal (ISO 11348-1:2007)
10. OECD, 2013. Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. OECD Publishing, Paris <http://dx.doi.org/10.1787/9789264203709-en>.
11. GraphPad Software Inc., San Diego California USA; [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)



## 9.2. Melléklet: Alkalmazott tápoldatok

### **YMM (leu-, ura-): leucin- és uracil szelektív alapműedium**

- 13,61 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- 1,98 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- 4,2 g KOH (lemezes)
- 0,2 g  $\text{MgSO}_4$
- 1 mL  $\text{FeSO}_4$  oldat (40 mg/50 mL víz)
- 50 mg L-hisztidin
- 50 mg adenin
- 20 mg L-arginin-HCl
- 20 mg L-metionin
- 30 mg L-tirozin
- 30 mg L-izoleucin
- 30 mg L-lizin-HCl
- 25 mg L-fenilalanin
- 100 mg L-glutaminsav
- 150 mg L-valin
- 375 mg L-szerin

1 liter desztillált vízben oldottam a fenti anyagokat, majd autoklávban steriliztem. Tárolása szobahőmérsékleten történt.

### **Growth Medium**

1 literhez szükséges mennyiség:

- 854,5 mL YMM alapműedium
- 10 mL vitamin oldat
- 100 mL glükóz oldat
- 25 mL L-aszparaginsav oldat
- 8 mL L-treonin oldat
- 2,5 mL  $\text{CuSO}_4$  oldat

Tárolása hűtőben, 4°C-on történt.

### **Vitamin oldat**

- 20 mg tiamin

- 20 mg piridoxin
- 20 mg pantoténsav
- 100 mg inozitol
- 50 mL biotin oldat (2 mg/100 mL)

Az összetevőket 500 mL desztillált vízben oldottam fel, majd 0,2 µm pórusátmérőjű szűrőn átszűrve steriliztem. 4°C-on tároltam.

#### **D-(+)-glükóz oldat**

20%-os glükóz oldatot készítettem, majd sterilizés után 4°C-on tároltam.

#### **L-aszparaginsav oldat**

4 mg/mL-es törzsoldatot készítettem desztillált vízben oldva. Sterilizés után szobahőmérsékleten tároltam.

#### **L-treonin oldat**

Desztillált vízben oldva 24 mg/mL-es oldatot állítottam össze. Sterilizés után, szintén szobahőmérsékleten tároltam.

#### **CuSO<sub>4</sub> oldat**

20 mM-os oldatot készítettem desztillált vízben oldva. 0,2 µm pórusátmérőjű szűrőn átszűrtem, és szobahőmérsékleten tároltam.

#### **LB tápoldat**

- 10 g tripton
- 5 g élesztőkivonat
- 10 g NaCl

Az összetevőket 1 liter desztillált vízben oldottam, majd autoklávban steriliztem.

#### **LB agar**

Az 1 liter LB tápoldatot 18 g agarral egészítettem ki.

### **9.3. Melléklet: A *Saccharomyces cerevisiae* tesztekben vizsgált hígítási sorok**

#### BLYR teszt:

BP-3: 438 – 0,214  $\mu\text{M}$  (100 – 0,05 mg/L)

4MBC: 983 – 0,246  $\mu\text{M}$  (250 – 0,06 mg/L)

EHMC: 51700 – 0,517  $\mu\text{M}$  (15000 – 0,15 mg/L)

OC: 41500 – 0,415  $\mu\text{M}$  (15000 – 0,15 mg/L)

#### Ösztrogén teszt:

E2: 0,367 – 1,12E-05  $\mu\text{M}$  (0,1 – 3,05E-06 mg/L)

BP-3: 438 – 0,214  $\mu\text{M}$  (100 – 0,05 mg/L)

4MBC: 983 – 0,240  $\mu\text{M}$  (250 – 0,06 mg/L)

EHMC: 51700 – 6,16E-03  $\mu\text{M}$  (15000 – 0,002 mg/L)

OC: 41500 – 4,95E-03  $\mu\text{M}$  (15000 – 0,002 mg/L)

#### Androgén teszt:

DHT: 0,344 – 1,68E-04  $\mu\text{M}$  (0,1 – 4,88E-05 mg/L)

BP-3: 438 – 0,214  $\mu\text{M}$  (100 – 0,05 mg/L)

4MBC: 393 – 0,024  $\mu\text{M}$  (100 – 0,006 mg/L)

EHMC: 51700 – 0,024  $\mu\text{M}$  (15000 – 0,006 mg/L)

OC: 41500 – 4,95E-03  $\mu\text{M}$  (15000 – 0,002 mg/L)

#### Antiösztrogén teszt:

4HT: 12,9 – 6,30E-03  $\mu\text{M}$  (5 – 0,002 mg/L)

BP-3: 438 – 9,13  $\mu\text{M}$  (100 – 2,08 mg/L)

4MBC: 9830 – 1,20  $\mu\text{M}$  (2500 – 0,31 mg/L)

EHMC: 51700 – 3,15  $\mu\text{M}$  (15000 – 0,92 mg/L)

OC: 36000 – 2,20  $\mu\text{M}$  (13000 – 0,79 mg/L)

#### Antiandrogén teszt:

FT: 724 – 0,088  $\mu\text{M}$  (200 – 0,02 mg/L)

BP-3: 438 – 0,11  $\mu\text{M}$  (100 – 0,025 mg/L)

4MBC: 9830 – 0,3  $\mu\text{M}$  (2500 – 0,076 mg/L)

EHMC: 51700 – 0,0985  $\mu\text{M}$  (15000 – 0,03 mg/L)

OC: 41500 – 0,0791  $\mu\text{M}$  (15000 – 0,03 mg/L)

#### 9.4. Melléklet: SDS-PAGE

A 10%-os elválasztó gél a következőkből állt: 3,3 mL 30%-os akril-amid; 2,5 mL Tris (1,5 M); 0,1 mL 10%-os SDS; 0,1 mL 1%-os ammónium perszulfát; 6 µL TEMED (tetrametiletilén-diamin); 4 mL dH<sub>2</sub>O.

A gyűjtő gél az alábbiakból állt 4 mL-re számolva: 0,67 mL 30%-os akril-amid; 0,5 mL Tris (1 M); 40 µL 10%-os SDS; 40 µL 1%-os ammónium perszulfát; 4 µL TEMED; 2,7 mL dH<sub>2</sub>O.

A futtató puffer összetétele: 25 mM Tris; 192 mM glicin; 0,1% SDS (végkoncentráció).

A 2-szeres töltő puffer összetétele 10 mL-re számolva: 1 mL 1 M Tris-HCl pH 6,8; 4 mL 10% SDS; 2 mL glicerol, 0,5 mL 1%-os brómfenolkék; 2,5 mL dH<sub>2</sub>O).

#### 9.5. Melléklet:

**A 4 UV-szűrő esetében kapott eredmények a *Saccharomyces cerevisiae* BLYES és BLYAS törzsekkel, illetve Kunz és Fent (2006) által alkalmazott rekombináns *Saccharomyces cerevisiae* törzssel az ösztrogén (Ö), androgén (A), antiösztrogén (Aö) és antiandrogén (Aa) tesztekben. A két vizsgálat eredménye közötti eltérést szürke színű cella és vastag betűs kiemelés jelzi.**

UV-szűrő	Saját mérés				Kunz és Fent (2006)			
	Ö	A	Aö	Aa	Ö	A	Aö	Aa
BP-3	<b>R</b>	N	<b>N</b>	<b>R</b>	<b>Ts</b>	N	<b>T</b>	<b>T</b>
4MBC	<b>Ts</b>	N	<b>R</b>	T	<b>N</b>	N	<b>T</b>	T
EHMC	N	<b>N</b>	T	T	N	<b>Ts</b>	T	T
OC	N	<b>N</b>	T	T	N	<b>Ts</b>	T	T

Jelmagyarázat:

N: nincs hatás

R: a görbe egy része már a sejttoxikus tartományba esik vagy oldhatósági probléma miatt nem teljes a görbe

T: teljes koncentráció-válasz görbe

Ts: szubmaximális teljes koncentráció-válasz görbe (a görbe magassága kisebb, mint a pozitív kontroll görbemagasságának 80%-a)

## 10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném megköszönni témavezetőimnek, Dr. Kriszt Baláznak és Dr. Krifaton Csillának a támogatásukat és a doktori munkám során nyújtott szakmai segítségüket. Hálával tartozom Dr. Tóth Ákosnak és Risa Anitának az 5 $\alpha$ -dihidrotesztozteron enzimátikus bontásának vizsgálatában nyújtott segítségükért. Köszönöm Dr. Cserháti Mátyásnak, hogy segítséget nyújtott a Wessling Hungary Kft-vel való kapcsolattartásban. Továbbá köszönetemet fejezem ki a Környezetbiztonsági és Környezettoxikológiai Tanszék, illetve a Regionális Egyetemi Tudásközpont minden kedves jelenlegi és volt kollégája felé, akik támogattak a doktori munkám során és számos értékes szakmai tanáccsal láttak el. Szeretném megköszönni a Halgazdálkodási Tanszék munkatársainak, hogy lehetővé tették számomra a zebradánió embrió teszt megvalósítását. Külön hálával tartozom Dr. Kovács Róbertnek és Dr. Csenki-Bakos Zsoltnak a teszt megvalósítása és kiértékelése során nyújtott szakmai segítségéért. Köszönetemet fejezem ki *M. Eldridgenek* és *G. Saylernek* a BLYES, BLYAS és BLYR tesztszervezetekért (The University of Tennessee, Knoxville, Tennessee). Végül szeretném megköszönni a családomnak, hogy mindvégig mellettem álltak, támogattak, és hogy hittek bennem.

Doktori munkám megvalósulását a következő pályázatok támogatták:

- KTIA-AIK-12-1-2013-0017 (BIOKLÍMA)
- Kutató Kari Kiválósági Támogatás – 1476-4/2016/FEKUT
- Kutató Kari Kiválósági Támogatás – 9878/2015/FEKUT
- Kutató Kari Kiválósági Támogatás – 8526-5/2014/TUDPOL
- Baross Gábor Program-2009 (REG\_KM\_KFI\_09; HALEDC09)
- TÁMOP-4.2.1B-11/2/KMR-2011-0003
- Dr. Krifaton Csillát a Bolyai János Kutatási Ösztöndíj támogatta