



Szent István Egyetem

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

UV-szűrők és az  $5\alpha$ -dihidrotesztoszteron, mint  
vízszennyező vegyületek káros hatásai és  
biodetoxifikációja

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. A munka előzményei, a kitűzött célok.....	4
2. Anyagok és módszerek.....	6
2.1. Az UV-szűrő vegyületek biológiai hatásmérése.....	6
2.2. Biodegradációs kísérletek 5 $\alpha$ -dihidrotesztoszteronnal.....	8
3. Eredmények.....	10
3.1. Az UV-szűrő vegyületek biológiai hatásmérése.....	10
3.2. Biodegradációs kísérletek 5 $\alpha$ -dihidrotesztoszteronnal.....	15
4. Következtetések és javaslatok.....	18
5. Felhasznált irodalom.....	22
6. A témával kapcsolatos megjelent publikációk listája.....	23

## 1. A MUNKA ELŐZMÉNYEI, A KITŰZÖTT CÉLOK

A természetes és főként a szintetikus vegyületek használata mindennapjaink része, melyek közül számos hormonháztartást megzavaró (ED – endocrine disruptor) hatással is jellemezhető. A szennyvíztisztítókból származó tisztított vizekből – melyeket szinte mindig felszíni vizekbe vezetnek be – számos esetben mutattak ki ED vegyületeket. A környezetünkben lévő, több ezer vegyület ED hatását először gyors és költséghatékony módszerekkel érdemes felderíteni, mely célra alkalmasak lehetnek az egysejtű bioripporter tesztrendszerek. Szükséges továbbá az ökoszisztémára gyakorolt káros hatások felderítése is ökotoxikológiai tesztek segítségével.

Szennyvizek, illetve felszíni vizek analitikai vizsgálata során a szteroid ösztrogének mellett egyre több figyelem irányul az androgén vegyületekre is. Környezeti mátrixokban a természetes androgén szteroidok közül általában az  $5\alpha$ -dihidrotesztoszteron (DHT) egyike a legmagasabb koncentrációban kimutatott vegyületeknek. A szteroid ösztrogének és androgének környezeti elemekből történő eltávolítása még 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 pl. az UV-sugárzást elnyelő, azaz UV-szűrő vegyületek. Annak ellenére, hogy nagy mennyiségben kerülnek felhasználásra, kevés ismerettel rendelkezünk a toxicitásukról, illetve a vízi élőlényekre gyakorolt kockázatukról. Rendelkezhetnek pl. agonista és antagonistá ED hatással is, ráadásul a legtöbb vegyület több, különböző hatással is jellemezhető. A szakirodalomban még kevés és olykor egymásnak ellentmondó eredmények találhatók az UV-szűrő vegyületek ED hatásával kapcsolatban. Mindemellett egyre több cikk számol be

a vízi élőlényekre gyakorolt olyan káros hatásaikról, mint pl. oxidatív stressz, növekedés gátlás, letalítás. Mindezek alapján fontos, hogy különböző 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 ED vegyületek közül a legmagasabb androgén aktivitással rendelkező DHT, míg a mesterséges eredetűek 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, antiösztrogén és antiandrogén, illetve sejttoxikus hatásának meghatározása biolumineszcens bioriporterekkel.
- A BP-3 toxicitásának prokarióta és eukarióta vízi testszervezeteken (*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.

## 2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

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

#### 2.1.1. **Hormonhatás és sejttoxikus hatás vizsgálata biorporter rendszerekkel**

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

Az ösztrogén és androgén hatást a biolumineszcencia alapú *Saccharomyces cerevisiae* BLYES (hER $\alpha$ ) és BLYAS (hAR) törzsekkel, míg a sejttoxikus hatást a *S. cerevisiae* BLYR törzssel vizsgáltam. A tesztvegyületek törzsoldatából mikrotiter lemezen felező hígítást készítettem metanollal, 3 párhuzamosban. Ezután a beállított sejtűrűségű tesztstruktúrát a mikrotiter lemez megfelelő üregeibe adagoltam, majd a lemezt 30°C-on inkubáltam 5 órán keresztül. Az 5. órában kapott biolumineszcencia (cps) értékeket a koncentráció ( $\mu$ 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 EC<sub>50</sub>, míg a sejttotoxicitást mérő teszt esetében az IC<sub>50</sub> értékeket (GraphPad Prism 5.03. program).

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

Az antagonisták hatás méréséhez a 2.1.1.1 fejezetben leírt vizsgálati módszert Sohoni és Sumpter (1998) rekombináns *Saccharomyces cerevisiae* törzsre kidolgozott eljárása szerint módosítottam. A vizsgálat elve, hogy a tesztstruktúrákhoz 65%-os hatást (EC<sub>65</sub>) kiváltó koncentrációban adagolt agonista 17 $\beta$ -ösztradiol (E2), illetve DHT által indukált biolumineszcenciát a vizsgált vegyület képes csökkenteni antiösztrogén, illetve antiandrogén hatása révén.

A *S. cerevisiae* BLYES és BLYAS törzsekkel a szakirodalom alapján még nem végeztek antagonista teszteket, így először az antiösztrogén 4-hidroxitamoxifen (4HT) és antiandrogén flutamid (FT) vegyületekre teszteltem a törzsek érzékenységét. A vegyületek hígítási sorát 3 párhuzamosban készítettem el, majd hozzáadagoltam az E2, illetve a DHT 65%-os hatást kiváltó koncentrációjú oldatát. A kiértékelés során szintén meghatároztam az átlagos NOEC és IC<sub>50</sub> értékeket (GraphPad Prism 5.03. és Microsoft Excel programok).

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

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

A szabványos (MSZ EN ISO 11348) akut *Aliivibrio fischeri* biolumineszcencia gátlási teszt 3 ismétlésben és 2-2 párhuzamosban zajlott. 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 (8,33-0,52 mg/L). A biolumineszcencia gátlást 30 perces kontaktidő után határoztam meg Microtox™ 500 luminométer segítségével. Megállapítottam a koncentráció-válasz görbe alapján a 20%-os és az 50%-os gátlási koncentrációt (IC<sub>20</sub> és IC<sub>50</sub>).

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

Az akut zebradánió embrió toxicitási tesztet a Szent István Egyetem, Halgazdálkodási Tanszékének munkatársai segítségével végeztem, az OECD 236-os útmutatója alapján. A vizsgált vegyület törzsoldatát DMSO-ban készítettem el, és 6 koncentrációt alakítottam ki recirkulációs rendszervíz segítségével (25 mg/L, 18 mg/L, 12 mg/L, 7 mg/L, 5 mg/L és 1 mg/L). A vizsgálat időtartamát 96 órától 120 órára növeltük, hogy a kelés után bekövetkező rendellenességek is megfigyelhetők legyenek. A vizsgálatot 4 ismétlésben, koncentrációként összesen 40 db embrióval végeztük, melyeket

10-10 embrióként helyeztünk el 24-lyukú lemezeken. Az embriókat  $27 \pm 1^\circ\text{C}$ -on inkubáltuk. A fejlődési rendellenességeken túl naponta feljegyeztük az elpusztult embriók számát és a 96. órában a kelési sikert is. A megfigyeléseket Leica M205FA sztereomikroszkóp segítségével végeztük. A hatásos koncentráció szintek meghatározása GraphPad Prism 5.03. programmal történt.

## **2.2. Biodegradációs kísérletek 5 $\alpha$ -dihidrotesztoszteronnal**

### **2.2.1. Biodegradáció élő sejtekkel**

A biodegradációs kísérletet 8 *Rhodococcus* (*R. erythropolis* AK35, *R. globerulus* AK36, *R. pyridinivorans* AK37, *R. gordoniae* AK38, *R. ruber* AK41, *R. aetherivorans* AK44, *R. coprophilus* N774, *R. pyridinivorans* K402) és 2 *Cupriavidus* (*C. basilensis* BRB6A és *C. basilensis* ÖR16) nemzetségbe tartozó törzsekkel valósítottam meg, melyek a Szent István Egyetem Környezetbiztonsági és Környezettoxicológiai Tanszékének gyűjteményében találhatóak meg. A kísérletet 3 párhuzamosban, LB tápoldatot tartalmazó Erlenmeyer lombikokban állítottam be, melyeket 72 órán keresztül inkubáltam ( $28^\circ\text{C}$ , 170 rpm). A tesztben a DHT kiindulási koncentrációja 100  $\mu\text{g/L}$  volt.

### **2.2.2. Biodegradáció extracelluláris kivonattal**

Vizsgálataimhoz a *R. pyridinivorans* AK37-es törzset választottuk ki, mivel a törzs teljes genom szekvenciája rendelkezésünkre áll, és számos szteroid bontásért felelős gént azonosítottak benne (Kriszt et al., 2012). A törzs 72 órás tenyészetét lecentrifugáltuk (19721,52 g,  $4^\circ\text{C}$ , 20 perc), majd a sterilre szűrt felülúszót centrifugacsövekbe pipettáztuk és kialakítottuk a kiindulási DHT koncentrációt. Az inkubáció  $28^\circ\text{C}$ -on 12 órán keresztül zajlott. Kontrollként alkalmaztunk egyrészt DHT-t tartalmazó LB tápoldatot, másrészt hősterilizéssel kezelt ( $121^\circ\text{C}$ , 20 perc, 1 bar) extracelluláris kivonatot és 1 mg/mL koncentrációjú proteináz K-val és 0,1%-os SDS-szel (sodium dodecyl sulphate) kezelt ( $37^\circ\text{C}$ , 6 óra) extracelluláris kivonatot.



Az enzimtermelés konstitutív vagy indukált jellegének meghatározásában Dr. Tóth Ákos (NAIK) és Risa Anita (SZIE KBKT) nyújtottak segítséget. A vizsgálathoz egyrészt a *R. pyridinivorans* AK37 DHT előinkubáció nélküli, másrészt 100 µg/L DHT-val előinkubált tenyészetéből hoztunk létre extracelluláris kivonatot. A kétféle extracelluláris kivonat fehérjeprofilját 2-2 párhuzamosban, SDS-PAGE (sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis) (10%-os gél) módszerrel (Laemmli 1970) hasonlítottuk össze.

### **2.2.3. A biodegradációs hatékonyság vizsgálata**

A biodegradációs kísérletekből származó minták DHT koncentrációjának meghatározása gázkromatográfia-tömegspektrométer (GC-MS) segítségével történt (Wessling Hungary Kft.). A felülúszó minták androgén és sejttoxikus hatásának vizsgálatát a 2.1.1.1 fejezetben ismertetett eljárás alapján végeztem. A felülúszó minták androgén hatását százalékos biolumineszcencia intenzifikációs értékben, míg sejttoxikus hatását biolumineszcencia gátlási értékben adtam meg.

### 3. EREDMÉNYEK

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

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

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

A BLYR teszt alapján a vizsgált koncentráció tartományban a tesztelt UV-szűrők közül egyedül a BP-3 rendelkezett sejttoxikus hatással. Az  $IC_{50}$  érték  $46,7 \pm 2,66 \mu\text{M}$ , 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. Ezáltal a BP-3 esetében a hormonhatást mérő tesztekben, a BLYR tesztben kapott NOEC ( $11,2 \pm 1,20 \mu\text{M}$ ) értékig lehet a hormonhatást egyértelműen meghatározni.

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

A BP-3 esetében a vegyület sejttoxikus hatása miatt fordított U-alakú görbét kaptam, így csupán NOEC értéket határoztam meg (1. táblázat). A 4MBC esetében parciális ösztrogén hatást tapasztaltam, a koncentráció-válasz görbe szigmoid alakú volt. Kunz és Fent (2006) vizsgálatában a 4MBC nem volt ösztrogén hatású a rekombináns *S. cerevisiae* törzssel vizsgálva, azonban a sejtfalbontó litikáz enzimet adva a tesztrendszerhez, a BLYES tesztbe hasonlóan parciális ösztrogén hatást mutattak ki (Schmitt et al., 2008). Az EHMC és az OC nem rendelkezett ösztrogén hatással a BLYES tesztben.

**1. táblázat: A benzofenon-3 és a 4-metilbenzilidén kámfor esetében az ösztrogén tesztben kapott NOEC és  $EC_{50}$  értékek átlaga és szórása, a 95%-os konfidencia intervallum (CI),  $R^2$  és Hill Slope értékek. (n.a.= nincs adat)**

Vegyület	NOEC ( $\mu\text{M}$ )	$EC_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	95% CI ( $\mu\text{M}$ )	$R^2$ (%)	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

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

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

### 3.1.1.4. A *Saccharomyces cerevisiae* BLYES és BLYAS törzsek antagonista tesztekben való alkalmazhatóságának vizsgálata

Az antagonista tesztekben a 4HT és a FT is fordított szigmoid alakú koncentráció-válasz görbét eredményezett. A kapott NOEC és IC<sub>50</sub> értékek a 2. táblázatban kerültek összefoglalásra. Kunz és Fent (2006) rekombináns élesztő tesztorganizmummal 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 (2. táblázat).

**2. 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
<b>4-hidroxitamoxifen</b>	0,14 ± 0,04	0,47 ± 0,08	0,42-0,51	99,3	-1,47
<b>Flutamid</b>	2,11 ± 0,39	9,45 ± 1,03	8,41-10,47	98,9	-1,74

Az eredmények alapján megállapítható, hogy mind a BLYES, mind a BLYAS törzs alkalmas antagonista tesztekben való alkalmazásra, mint tesztorganizmum.

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

A BP-3 esetében a sejttoxikus koncentrációtartomány alatt nem tapasztaltam antiösztrogén hatást. A 4MBC mutatott antiösztrogén hatást, azonban a koncentráció-válasz görbe nem teljes az oldhatósági határ elérése miatt. Az EHMC és OC esetében teljes koncentráció-válasz görbét kaptam. A

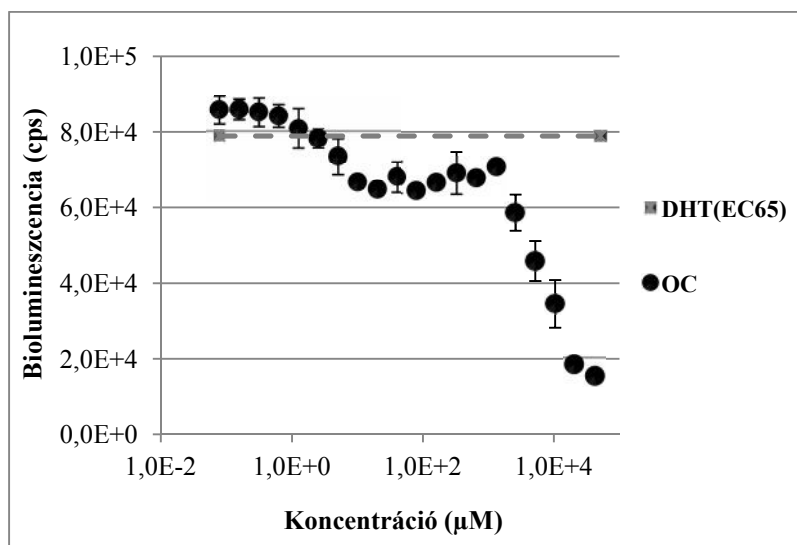
NOEC és IC<sub>50</sub> értékeket a 3. táblázat tartalmazza. A teszt eredménye alapján a 4MBC, EHMC és OC nem rendelkezik jelentős antiösztrogén hatással a 4HT NOEC és IC<sub>50</sub> értékeihez képest (2. táblázat).

**3. 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

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

A BLYAS törzzsel végzett vizsgálatban mind a 4 UV-szűrő mutatott antiandrogén hatást, az OC esetében ráadásul a hatás nem-monoton görbével írható le (1. ábra).



**1. ábra: Az oktokrilén (OC) antiandrogén hatása a *Saccharomyces cerevisiae* BLYAS törzzsel vizsgálva, illetve az 5α-dihidrotesztoszteron (DHT) 65%-os hatásos koncentrációja (EC<sub>65</sub>) által kiváltott átlagos biolumineszcencia**

A BP-3 NOEC értéke (4. táblázat) a pozitív kontroll FT esetében kapott NOEC értékkel (2. táblázat) nagyságrendileg megegyezett. A 4MBC szintén jelentős antiandrogén hatással jellemezhető a BLYAS teszt alapján (4. táblázat). Az EHMC és az OC habár mutatott antiandrogén hatást (4. táblázat), az IC<sub>50</sub> értékek 3 nagyságrenddel magasabbak voltak, mint a FT IC<sub>50</sub> értéke.

**4. 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

### 3.1.1.7. Új tudományos eredmények (az 3.1.1 fejezet alapján)

**1. tézis:** A *Saccharomyces cerevisiae* BLYR törzssel sejttöxikus hatást mutattam ki a benzofenon-3 esetében. A vegyület a teszt szerkezet biolumineszcenciáját  $46,7 \pm 2,66 \mu\text{M}$  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.**

### 3.1.2. Toxikus hatás vizsgálata vízi tesztszervezeteken

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

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

A BP-3  $1,16 \pm 0,51$  mg/L koncentrációban 20%-kal, míg  $5,55 \pm 0,97$  mg/L koncentrációban 50%-kal gátolta az *A. fischeri* biolumineszcenciáját.

#### 3.1.2.2. Zebradánio (*Danio rerio*) embrió teszt (OECD 236)

A BP-3 koncentráció-függő módon növelte az elpusztult zebradánio embriók számát. Az LC<sub>50</sub> értékek az idő előrehaladtával csökkenő tendenciát mutattak. Ezenkívül a BP-3 koncentráció-függő módon a zebradánio embriók farki részének torz fejlődését eredményezte, illetve gátolta az úszóhólyag feltöltődését és az embriók kelését. Az LC<sub>50</sub>, EC<sub>50</sub> és az IC<sub>50</sub> értékek az 5. táblázatban lettek feltüntetve.

**5. táblázat: A zebradánio (*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 bekezdésben említett fejlődési rendellenességeken túl állkapocs deformációt is okozott, melyet több egyednél is megfigyeltem. 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) is előfordult ez a deformáció.

### 3.1.2.3. Új tudományos eredmények (az 3.1.2 fejezet alapján)

**4. tézis: A 120 órás zebradánió (*Danio rerio*) embrió teszt alapján megállapítható, hogy a benzofenon-3 (BP-3) letális az embriókra ( $LC_{50,120\text{hpf}} = 12,14 \pm 0,98$  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.**

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

### 3.2.1. Biodegradáció élő sejtekkel

A DHT biodegradációs kísérletből származó minták analitikai elemzése alapján (6. táblázat) a vizsgált törzsek kiváló DHT biodegradációs képességgel rendelkeztek, mivel a meghatározási határérték alá csökkent a DHT koncentrációja mind a pellet, mind a felülúszó mintákban.

A BLYR törzssel végzett vizsgálat alapján sejttoxikus hatást nem tapasztaltam a 72 órás kísérlet során, mivel a felülúszó minták nem okoztak biolumineszcencia gátlást (6. táblázat).

A BLYAS teszt eredménye (6. táblázat) alapján a kontrollban a kiindulási DHT koncentráció 550%-kal növelte a tesztorganizmus alap biolumineszcenciáját. 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 biodetoxifikációs potenciál elégtelen volt, mivel még közel 200%-os biolumineszcencia intenzifikációt mértem (6. táblázat). Tehát a

DHT bontása magas androgén potenciállal rendelkező metabolitokig ment végbe. A törzs 7 napra növelt inkubációs idő alatt sem tudott teljes biodetoxifikációt elérni, mivel a 7. napon is jelentős androgén hatást mértem (237%) a kontrollhoz (447%) képest (az eredményeket nem ábrázoltam).

**6. táblázat: A biodegradációs kísérlet 72. órájában levett minták 5 $\alpha$ -dihidrotesztoszteron tartalma gázkromatográfia-tömegspektrometriás (GC-MS) mérés alapján, illetve a minták androgén és sejttoxikus hatása a *Saccharomyces cerevisiae* BLYAS és BLYR törzsekkel vizsgálva. A táblázatban átlag értékek szerepelnek szórással**

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

### 3.2.2. Biodegradáció extracelluláris kivonattal

A GC-MS vizsgálat alapján (7. 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 (7. táblázat).

**7. táblázat: *Rhodococcus pyridinivorans* AK37 aktív, illetve inaktív extracelluláris kivonatában gázkromatográfia-tömegspektrométer (GC-MS) módszerrel mért átlagos 5 $\alpha$ -dihidrotesztoszteron (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 az androgén aktivitás a 9. órára szűnt meg teljesen (az eredményeket nem ábrázoltam).

A következő extracelluláris kivonattal végzett vizsgálat a DHT bontásában részt vevő enzimek indukált vagy konstitutív termelésének meghatározására irányult. E kísérlet eredménye alapján a DHT-val előinkubált *R. pyridinivorans* AK37 extracelluláris kivonatának SDS-PAGE módszerrel felvett fehérje profilja megegyezett a DHT előinkubáció nélküli extracelluláris kivonat fehérje profiljával (az eredményeket nem ábrázoltam). Az SDS-PAGE módszer alapján feltételezhető, hogy a DHT bontásában részt vevő enzimek konstitutívan termelődnek.

### 3.2.3. Új tudományos eredmények (az 3.2 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.**

## 4. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

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 tesztorganizetek, 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.

Az OC esetében, az antiandrogén tesztben nem-monoton koncentrációválasz görbét kaptam. Feltételezhetően 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.

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. Tehát e tesztorganizetek nem eléggé érzékenyek a vizsgált UV-szűrők agonista és antagonistá 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. Eredményeim és a szakirodalmi adatok alapján javaslom a 4 UV-szűrő hormonhatását környezetileg releváns koncentrációkban vízi szervezeteken feltérképezni a hormonháztartáshoz kapcsolódó gének expressziójának vizsgálata alapján.

Az emberek esetében azonban nem a környezeti expozíció, hanem a kozmetikumok alkalmazása jelenti a legnagyobb UV-szűrőknek való kitettséget. A bőrön keresztül felszívódó UV-szűrők 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. Ezek alapján fontos lenne felülvizsgálni, hogy mekkora koncentrációban tartalmazzon UV-szűrő vegyületet egy adott kozmetikum.

A vízi tesztszervezetekkel kapott eredményeim alapján a BP-3 a környezetben eddig mért legmagasabb koncentrációjánál több nagyságrenddel magasabb koncentrációban fejtette ki a hatását. Azonban érdemes lenne akut tesztek mellett krónikus vizsgálatokat is végezni, mivel a zebradánió embrió tesztnél az idő előrehaladtával az  $LC_{50}$  értékek csökkenő trendje volt megfigyelhető. Tehát elképzelhető, hogy a környezetben alacsonyabb koncentrációban előforduló BP-3 hosszútávon hasonló hatást fejt ki, mint azt az akut tesztnél 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, míg az izomrostok elváltozását mikroszkópos szövettani vizsgálattal célszerű tanulmányozni.

Az úszóhólyag feltöltésének hiányához egyrészt vezethetett a farki rész torzulása, mely akadályozhatta a zebradániókat a víz-levegő határfelülethez való

felúszáshoz. Másrészt érdemes megvizsgálni, hogy a BP-3 gátolja-e a zebradánió gázmirigy sejtjeiben az úszóhólyag feltöltésében szerepet játszó felületaktív vegyület bioszintézisét. 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 aril szénhidrogén receptor (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 kísérletre alkalmas lehet a genomján az *ahr* gént tartalmazó, biolumineszcens *Saccharomyces cerevisiae* törzs. Mivel Fong és mtsai (2016) a BP-2 esetében is tapasztaltak állkapocs deformációt a zebradánió embrióknál, így 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, melyet egyrészt okozhatott a torz farki rész, másrészt 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* ŐR16 esetében kapott eredmény rávilágít a biológiai hatásmérő tesztek fontosságára az analitikai vizsgálatok mellett, hiszen kiváló DHT bontás mellett is tapasztalhatunk még jelentős androgén aktivitást.

Mivel a *C. basilensis* ŐR16-os törzs 7 nap alatt sem tudta megszüntetni az androgén aktivitást a DHT bontási kísérletben, így feltételezhetően 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* ŐR16 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.

Az SDS-PAGE módszerrel felvett fehérjeprofili alapján a DHT bontásában szerepet játszó extracelluláris enzimek termelése feltehetőleg konstitutív. Azonban az eredmény megerősítéséhez jövőbeni célom, hogy az enzimtermelődést a hatékonyabb fehérje elválasztást lehetővé tevő 2D PAGE módszer segítségével is vizsgáljam.

## 5. FELHASZNÁLT IRODALOM

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.

Kriszt B., Tánicsics A., Cserháti M., Tóth Á., Nagy I., Horváth B., Nagy I., Tamura, T., Kukolya J., Szoboszlay S. (2012): De Novo Genome Project for the Aromatic Degradator *Rhodococcus pyridinivorans* Strain AK37. *Journal of Bacteriology* 194(5): 1247.

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.

Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-685.

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.

Sohoni, P. & Sumpter, J. P. (1998): Several environmental oestrogens are also anti-androgens. *Journal of Endocrinology* 158: 327–339.

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.

## 6. A TÉMÁVAL KAPCSOLATOS MEGJELENT PUBLIKÁCIÓK LISTÁJA

**Tudományos folyóiratokban megjelent (közlésre elfogadott) lektorált, teljes szövegű tudományos közlemény:**

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

**A. Balázs**, C. Krifaton, I. Orosz, S. Szoboszlay, R. Kovács, Z. Csenki, B. Urbányi, B. Kriszt (2016): Hormonal activity, cytotoxicity and developmental toxicity of UV filters. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 131: pp. 45-53. **(IF: 3,974)**

**A. Balázs**, I. Orosz, C. Krifaton (2015): Hormonmoduláns hatású szerves UV-szűrő vegyületek. *Biokontroll* (közlésre elfogadva: 2015.02.20.)

**Kongresszusi kiadványokban megjelent közlemények:**

**A. Balázs**, B. Kriszt, I. Orosz, S. Szoboszlay, R. Kovács, Z. Csenki, B. Urbányi, C. Krifaton (2015): A benzofenon-3 káros hatásai és biodetoxifikációs lehetőségei. V. Ökotoxikológiai Konferencia, Budapest, 2015.11.20. p. 7-8. Darvas B. főszerk. V. Ökotoxikológiai Konferencia előadás és poszter kötete. Magyar Ökotoxikológiai Társaság, 2015. ISBN 978-963-89452-5-9

**A. Balázs**, B. Kriszt, I. Orosz, C. Krifaton (2015): Adaptation of bioluminescent yeast strains for measuring the multiple hormonal and the cytotoxic activities of four UV filters. SETAC Europe 25th Annual Meeting, Barcelona, 2015.05.03-07. (<http://meetings.setac.org/frontend.php/presentation/listForPublic>)

**A. Balázs**, B. Kriszt, I. Orosz, C. Krifaton (2014): Hormonal activities of four UV filters measured by bioluminescent yeast bioreporters - A Magyar

Mikrobiológiai Társaság 2014. évi Nagygyűlése és EU FP7 PROMISE Regional Meeting: Absztraktfüzet. pp. 4-5.

**A. Balázs**, C. Krifaton, A. Risa, M. Cserháti, Z. Padla, B. Kriszt (2013): Biodegradation of dihydrotestosterone as a micropollutant with androgen-disrupting potency. In: K. Márialigeti (szerk.) *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica: Abstracts of the 4th Central European Forum for Microbiology*. Keszthely, Magyarország, 2013.10.16-2013.10.18. Budapest: Akadémia Kiadó, pp. 112-113. (ISSN: 1217-8950)

**Témában megjelent publikációk összesített impakt faktora: 7,536**