

Hidrotoxikológia

Bevezetés

A hidrotóxicológia fogalma

- A hidrotóxicológia a különböző vegyszerek, természetes és ember által alkotott anyagok és tevékenységek (összesítve: mérgező anyagok vagy készítmények) vízi szervezetekre gyakorolt hatását vizsgálja a szerveződés különböző szintjein, a sejten belülről az egyeden keresztül a társulásokig és az ökológiai rendszerekig.

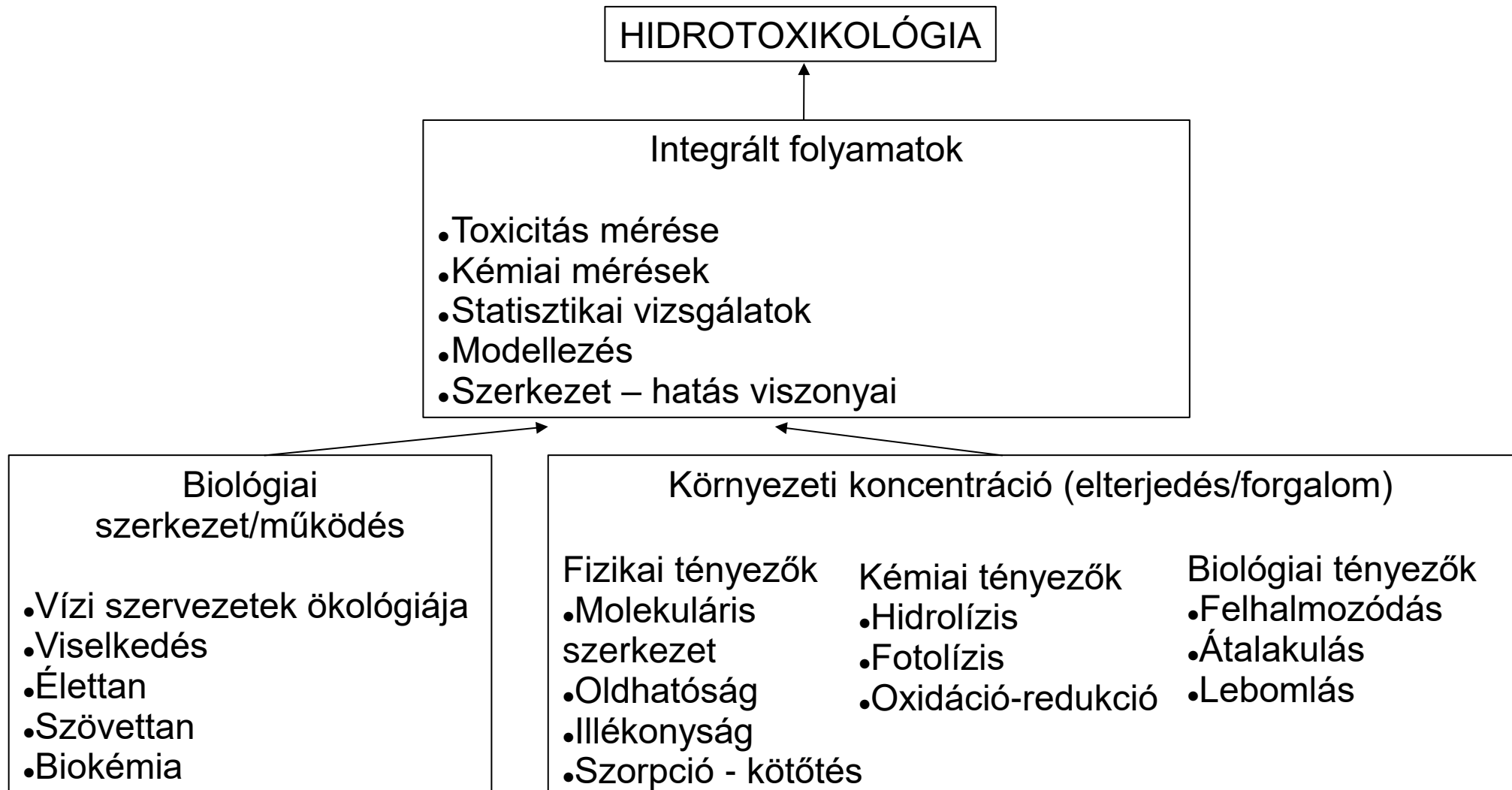
A vízi szervezeteket érő hatások

- Általában kedvezőtlen hatásokat vizsgál a hidrotóxicológia
 - Rövid és hosszú távú letalitás
 - Szubletális hatások: megváltozik
 - Viselkedés
 - Növekedés
 - Szaporodás
 - Táplálkozás
 - Mérgek semlegesítése
 - Szövetek szerkezete
- Szöveti-szervi szinten
 - Enzimek működésének gátlása vagy serkentése
- Állomány szinten
 - A faj geno- és fenotípusának megváltozása
 - Egyedszám és relatív gyakoriság megváltozása

A hatások számszerűsítése

- Elpusztult vagy túlélő egyedek száma
- Szaporodás sikeressége
- Teljes test (hossz, súly)
- Szervek kondíciója
- Teratogén rendellenességek (tumorok)
- Enzimaktivitás (serkentés vagy inhibíció)
- Fajszám
- Egyedszám és sűrűség
- Expozíció helyei:
 - Víz
 - Üledék
 - Táplálék

Hidrotóxiológia: az ökotóxiológia egyik ága



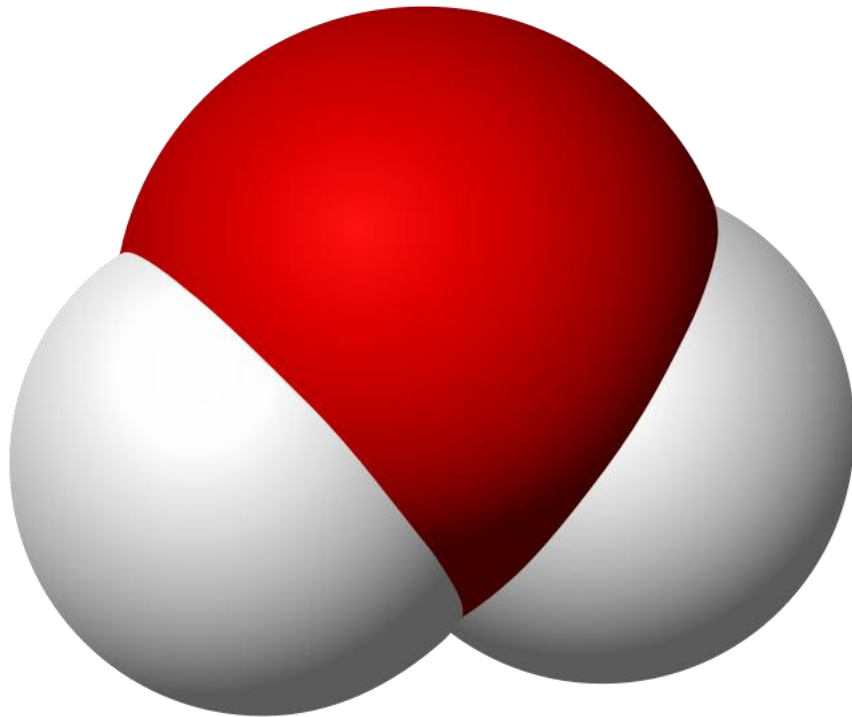
A vízi környezet

- Típusok:
 - Édesvízi
 - Patakok
 - Tavak
 - Halastavak
 - Folyók
 - Brakkvízi
 - Tengeri
 - Partvidéki
 - Nyílt vízi
 - Mélységi
- Élő (biotikus) tényezők:
 - Élőlények
- Élettelen (abiotikus) tényezők:
 - Víz, aljzat, üledék, oldott lebegő részecskék

A vízi élőhelyek érzékenysége

- Függ
 - A vegyi anyag és reakciótermékei fizikai-kémiai tulajdonságaitól
 - Az élőhelyre bekerülő vegyi anyag koncentrációjától és terhelésétől
 - A hatás időtartamától és típusától
 - Heveny és idült
 - Rövid távú vagy folyamatos terhelés
 - Az élőhely ellenálló képessége a vegyszer hatásaival szemben
 - Az élőhely elhelyezkedése a szennyezőforrás helyéhez képest

A vízi ökoszisztémák elemei: a víz



- A víz a vízi szervezetek létfenntartó vegyülete
- Erősen poláros vegyület – az oxigénatom páratlan elektronjai negatív töltést eredményeznek
- Poláros kovalens kötés a molekulán belül – hidrogénkötések a molekulák között
- A víz a poláros molekulájú vegyi anyagok kiváló oldószere

A cseppfolyós víz fontosabb tulajdonságai

Tulajdonság	Összehasonlítás más vegyi anyagokkal	Fontossága a vízi környezetben
Fajlagos hőkapacitás	Magasabb, mint bármelyik szilárd és cseppfolyós anyagé, a cseppfolyós ammónia, cseppfolyós hidrogén és lítium kivételével	Megakadályozza az erős hőingadozást a vízben és stabilizálja az élőlények testhőmérsékletét
Olvadáshő	Magasabb, az ammónia kivételével	Hőstabilizáció a víz fagyáspontján a rejtett hő megkötése és felszabadulása révén
Párolgáshő	Magasabb, mint bármelyik vegyületé	Meghatározza a hó és vízmolekulák átvitelét a légkör és a vízi rendszerek között
Sűrűség (vagy hőtágulás)	A tiszta édesvíz maximális sűrűségét 4°C-on éri el, a tengervíz a fagyáspontja (-1,9°C) körül.	Az édesvíz és hígított tengervíz a maximális sűrűségét a fagyáspont felett éri el; a hőeloszlás és függőleges áramlás szabályozása rétegzett tavakban
Felületi feszültség	Magasabb, mint bármelyik folyadéké a higany kivételével	A sejtéletlen szabályozó tényezője, felületi tényezők és cseppképződés
Oldóerő	Több vegyianyagot és nagyobb mennyiségben képes feloldani, mint bármelyik természetes folyadék	Segíti a kémiai reakciókat (pl. a hidrolízist) és a tápanyagok és melléktermékek transzportját a biológiai rendszerekben
Dielektromos állandó	A tiszta édesvízé magasabb, mint bármelyik folyadéké, kivéve a hidrogén-peroxidot és hidrogén-cianidot	A szerves anyagok magas oldékonysága az ionizáció révén
Átlátszóság	A sugárzó energia elnyelése magas az infravörös és ibolyántúli fény magasabb hullámhosszai esetében, a látható tartományban kismértékű szelektív elnyelés	Lehetővé teszi, hogy a fotoszintézis és fotolízis nagy mélységekben is végbemenjen

A víz összetétele

- Vizek csoportosítása a velencei rendszer (sótartalom) szerint:
 - $>30\text{‰}$ – tengervíz
 - $0,5\text{-}30\text{‰}$ – brakkvíz
 - $<0,5\text{‰}$ – édesvíz
- Oldott gázok:
 - Oxigén
 - Oldhatósága függ a hőmérséklettől, az oxigén parciális nyomásától a levegőben és a sótartalomtól
 - Szén-dioxid
 - Puffer szerep: CO_2 , HCO_3^- és CO_3^{2-} aránya pH-függő

A víz összetétele

- Oldott szervetlen anyagok
 - Ca, Mg, Na, K, P, Fe, S, Si
- Oldott szerves anyagok
 - Szénhidrogének
 - Szénhidrátok
 - Lipidek
 - Zsírsavak
 - Aminosavak
 - Nukleinsavak
- Az anyagok oldódása alapján:
 - $>0,45 \mu\text{m}$: lebegőanyagok
 - $<0,45 \mu\text{m}$: oldott anyagok
 - $0,2-0,45 \mu\text{m}$: diszperz, ülepedhető anyagok
 - $0,001-0,2 \mu\text{m}$: kolloidok
 - $<0,001 \mu\text{m}$: valódi oldott anyagok
- Ennek megfelelően:
 - Lebegő szervesanyag (POM)
 - Oldott szervesanyag (DOM)
 - Összes szervesanyag (TOM)

A víz összetétele

- Szervesanyag helyett könnyebben mérhető:
 - Lebegő szerves széntartalom (POC)
 - Oldott szerves széntartalom (DOC)
 - Összes szerves széntartalom (TOC)
- Mérése analóg a szervesanyaggal, értéke általában annak fele
- Tavakban
 - POC általában a DOC 10%-a
 - POC
 - Oligotróf tavakban 1-4 mg/l
 - Eutróf tavakban 3-34 mg/l
 - Disztróf tavakban 20-50 mg/l
- Huminanyagok
 - A DOC nagy hányada
 - Mikrobiális bontásnak ellenállnak
 - Abiotikus kémiai reakciók során jönnek létre
 - Oldhatóság alapján:
 - Huminsavak – lúgos pH-n
 - Fulvosavak – savas pH-n
 - Humin - nem oldható és nem kivonható
 - Fémek természetes kötőanyagai, kelátorok
- A szervesanyag eredete édesvízi rendszerekben:
 - Nagyobb tavak: autochton – belső eredetű
 - Kisebb tavak – allochton – külső eredetű

A vegyi anyagok környezeti koncentrációját befolyásoló tényezők

- A vegyi anyag fizikiai-kémiai tulajdonságai:
 - Molekuláris szerkezet
 - Vízoldhatóság
 - Gőznyomás
- A vízi környezet fizikai, kémiai és biológiai tulajdonságai
 - Felszín – térfogat viszonyai
 - Hőmérséklet
 - Sótartalom
 - pH
 - Áramlás
 - Mélység
 - Oldott anyagok mennyisége
 - Üledékrészecskék mérete
 - Az üledék szerves széntartalma
- A vegyi anyag környezetbe jutásának forrása és sebessége
- Környezeti szennyező források előjelzéséhez fontos

A vegyi anyagok biológiai hozzáférhetősége a vízben

- Oldott állapotban
 - Készen elérhető a szervezetek számára a vízoszlopban
- Biotikus vagy abiotikus összetevőkhöz kötötten a vízoszlopban vagy az üledékben
 - Általában nem elérhető, hidrofób anyagok, kivéve a bentsz szervezetei által felvehető anyagokat
- A szervezetekbe beépült anyagok

A biológiai hozzáférhetőség összetevői

- Környezeti hozzáférhetőség
 - Egy vegyi anyag azon része, amely részt tud venni egy adott folyamatban és fizikai, kémiai és biológiai úton módosulhat.
- Környezeti biológiai hozzáférhetőség
 - A környezeti hozzáférhetőséggel rendelkező anyag azon része, amit egy élő szervezet valamely környezeti tényezővel találkozáva ténylegesen felvesz. A szervezet általános felvevő hatékonyságának mérőszáma.
- Toxikológiai biológiai hozzáférhetőség
 - Az expozíciós koncentráció vagy dózis azon része amelyet a szervezet felvesz majd élettani funkcióin keresztül eljuttat a toxicitás célterületeihez vagy receptoraihoz. A biológiai hozzáférhetőség (biológiai hasznosulás) klasszikus gyógyszer-toxikológiai definíciója.

Perzisztencia

- Azt az átlagos időt, amit a vegyszer egy adott közegben (pl. víz, üldek, stb.) eltölt, mielőtt valamilyen transzport folyamat eltávolítaná onnan, *tartózkodási időnek* hívjuk. Az egyensúlyi tartózkodási időnek a vegyszer adott közegben található teljes mennyiségének és a vegyszer utánpótlási és kiürülési ütemének az arányát nevezzük.
- Perzisztens anyagok azok, amelyek hosszú ideig jelen vannak a környezetben és felhalmozódnak a toxikus szintig. A perzisztencia mérőszáma a *felezési idő*, ami az anyag eredeti koncentrációjának a felére csökkenéséhez szükséges időmennyiség.

Anyagok transzformációja

- Abiotikus transzformáció (átalakulás):
 - Hidrolízis
 - Oxidáció
 - Fotolízis
- Biotikus transzformáció (enzimatis úton):
 - Biodegradáció: mikrobiális transzformáció, amelynek során a vegyszer energiaforrásként hasznosul és a maradványai egyszerű szerves vagy szervetlen molekulákká alakulnak.
 - A teljes biodegradációt, amelynek eredménye CO_2 , H_2O és egyéb egyszerű szerves vagy szervetlen molekulák mineralizációnak hívjuk. Általában, a poláros, vízoldható formák felé tart.

Alapfogalmak

- Méreg: olyan anyag, amely egy biológiai rendszerben káros válaszreakciót vált ki, illetve súlyosan veszélyezteti annak szerkezetét és működését amely akár halálhoz is vezethet.
 - A vízi környezetbe kétféle forrásból juthatnak:
 - Nem pontszerű (diffúz) források
 - Pontszerű források
- Szennyezőanyag: szélesebb értelemben használt kifejezés, kedvezőtlen abiotikus hatásokat is kiválthat

Alapfogalmak

- Szennyezés: emberi tevékenység révén a környezetbe (vizekbe) kerülő kedvezőtlen hatást kiváltó anyagok vagy energia.
 - Károsítja a szervezeteket
 - Veszélyes az emberi egészségre
 - Hátráltatja a vízzel kapcsolatos tevékenységeket (halászat, halgazdálkodás)
 - Víztisztaság romlása
- Szennyvíz: vízalapú szennyező anyag

Alapfogalmak

- Toxicitás: a vegyszer káros hatást kiváltó képességének relatív jellemzője.
 - Függ a vegyszer koncentrációjától, összetételétől, az expozíció időtartamától, az érintett biológiai mechanizmustól és a külső körülményektől.
- Toxicitás vizsgálatok: egy vegyszer káros hatásainak mérése szabályozott körülmények között.
- Közvetlen toxicitás: a mérég közvetlenül a célterületre vagy szervezetre hat
- Közvetett toxicitás: a kémiai, fizikai és/vagy biológiai környezet megváltozása következtében jelentkező toxicitás
- A legtöbb kísérleti toxicitás vizsgálat a közvetlen hatásokat elemzi egy fajon.

Toxikus hatások

- Azonnali hatás – késleltetett hatás
- Reverzibilis – irreverzibilis
- Helyi hatás – szervezeti hatás
- Nem szelektív
 - Narkózis
- Szelektív
 - Szövetspecifikus
 - Szervspecifikus
 - Fajspecifikus
- Szerkezet és hatás kölcsönhatásai

A toxikológia alapelvei

- Ok-okozati összefüggés megléte – a mért válasz egyértelműen a mérreg és a szervezet vagy szervezetben lévő célterület kölcsönhatásának eredménye
- Dózis- vagy koncentráció-függő összefüggés megléte
 - A mért válasz a mérreg és a szervezet vagy szervezetben lévő célterület kölcsönhatásának eredménye
 - A célterületet érő mérreg mennyisége a szervezet expozíciójának függvénye
 - Egy valós vagy statisztikai határérték felett a hatás vagy válaszreakció mértéke arányos a célterületet érő mérreg mennyiségével
- A hatások számszerűsíthetők: a toxicitás hatásain vagy válaszai megismételhető módon mérhetők és számszerűsíthetők.

A toxikus hatás három fázisa (3 Ps)

Expozíció

exPosure

- fizikai tényezők
- kémiai tényezők
- biológiai tényezők
 - expozíció útvonala
 - kémiai forma
 - hőmérséklet
 - biológiai hozzáférhetőség
 - egyéb

Toxikokinetika

Partitioning

- abszorpció
- elterjedés
- anyagcsere
- kiválasztás

Toxikodinamika

Potency

- a molekulák hatása a toxicitás célterületein
- a toxikus hatás módja/mechanizmusa szerinti jellemzés
- fajon belüli és fajok közötti különbségek az érzékenységben

KÜLSŐ

BELSŐ

→ Biológiai akkumuláció

→ Toxicitás

A toxicitást befolyásoló tényezők

- Az expozícióval kapcsolatos tényezők
 - Expozíció típusa – vízben, üledékben, táplálékon keresztül, levegőben.
 - Expozíció időtartama – akut (heveny), krónikus (idült).
 - Expozíció gyakorisága.
 - A mérreg koncentrációja.
- A szervezettel kapcsolatos tényezők
 - Faj, fejlődési stádium
- A vegyi anyaggal kapcsolatos tényezők
 - Összetétel (szennyeződések a vegyi anyagon belül), oldhatóság, gőznyomás, pH, lipofilitás.

A toxikus anyagok és hatásai

- Csoportosítási lehetőségek:
 - Célterület szerint
 - Hatás szerint
 - Felhasználási terület szerint
 - Kémiai tulajdonságok szerint
 - Toxicitás szintje szerint

Fémek és félfémek

- Nehézfémek – atomsúlyuk nagyobb 40-nél
 - Vízi rendszerekben fontosak:
 - Réz
 - Cink
 - Kadmium
 - Higany
 - Ólom
 - Egyéb (alumínium, króm, szelén, ezüst, arzén, antimon)
- Félfémek – nem fémes elemek, sok fémekre jellemző tulajdonsággal

Szervetlen és szerves anyagok

- Nemfémes szervetlen anyagok
 - Cl, Cl⁻, N, P, B, NH₃, NO₂⁻, NO₃⁻
- Szerves anyagok
 - Poliklórozott bifenilek (PCB)
 - Dioxinok (PCDD) és furánok (PCDF)
 - *2,3,7,8-tetraklór-dibenzo-p-dioxin*
 - Policiklusos aromás szénhidrátok (PAH)
 - Vízi ökoszisztémákban az üledékben és a lebegőanyagban vannak jelen
 - Szintetikus oldószerek
 - Alkilbenzin-szulfonát – tisztítószer, olajszennyeződések oldószerei

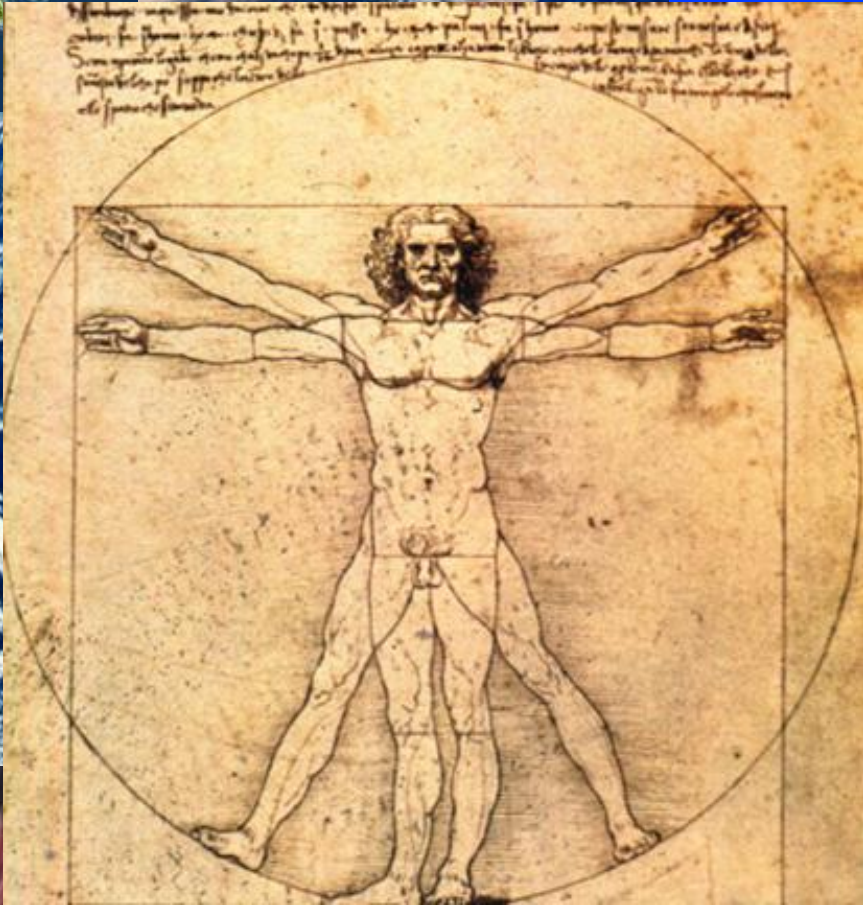
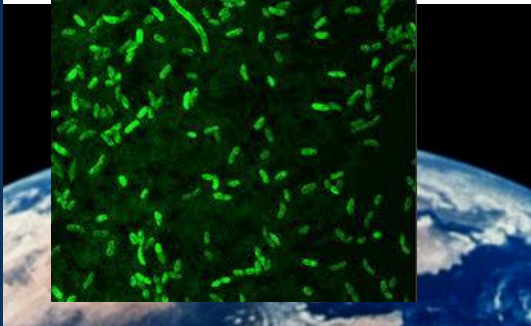
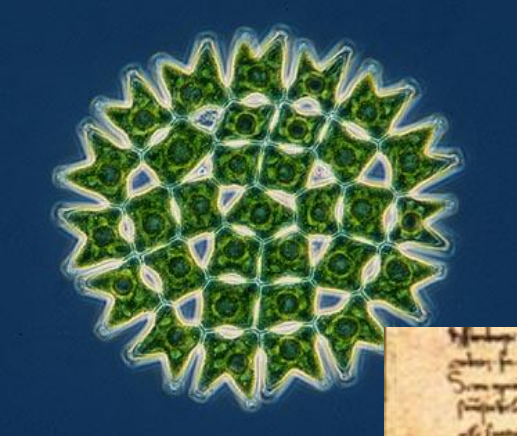
Szerves anyagok

- **Növényvédőszer**
 - A toxikus hatásuk miatt használják őket
 - Vizekbe igen könnyen bejutnak
 - Legtöbb esetben specifikusak
 - Használatuk külső körülményeken is múlik
 - Állóvizekben hosszú ideig kis koncentrációban is jelen lehetnek
- **Radioaktív szerek**
 - Felhalmozódnak az üledékben, az oldhatóság révén a tápanyagforgalomba jutnak

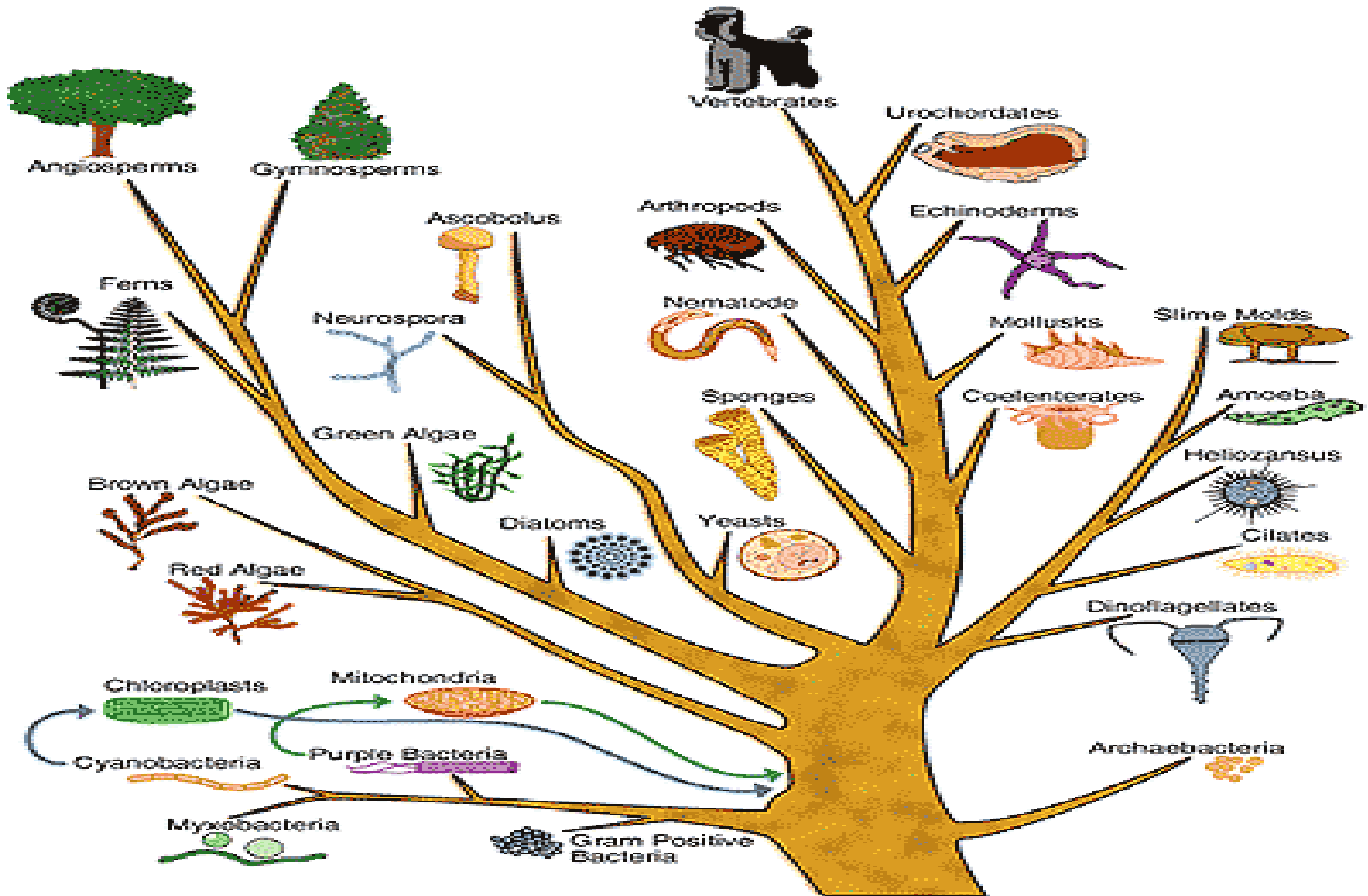
Toxikus hatások típusai

- Akut hatások
- Krónikus vagy szubkrónikus hatások
- Letális hatás
- Szubletális hatások
 - Viselkedésbeli
 - Élettani
 - Biokémiai
 - Szövetteni
- Közösségek szintjén mért hatások
 - Közösségek struktúráját megváltoztató hatások
 - Közösségek szerepét megváltoztató hatások
 - Mérés
 - Fajgazdagság
 - Relatív egyedsűrűség

Hidrotoxikológia 2. óra



Baktériumok



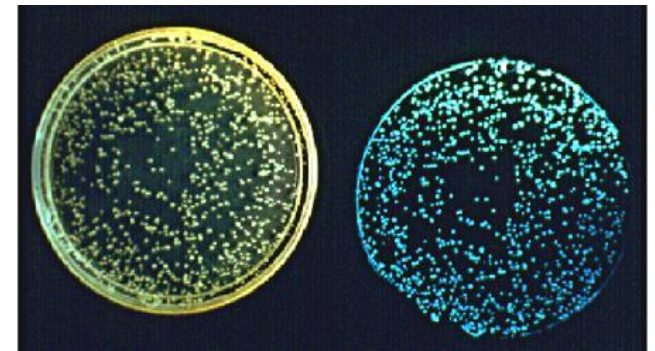
Vibrio fischeri



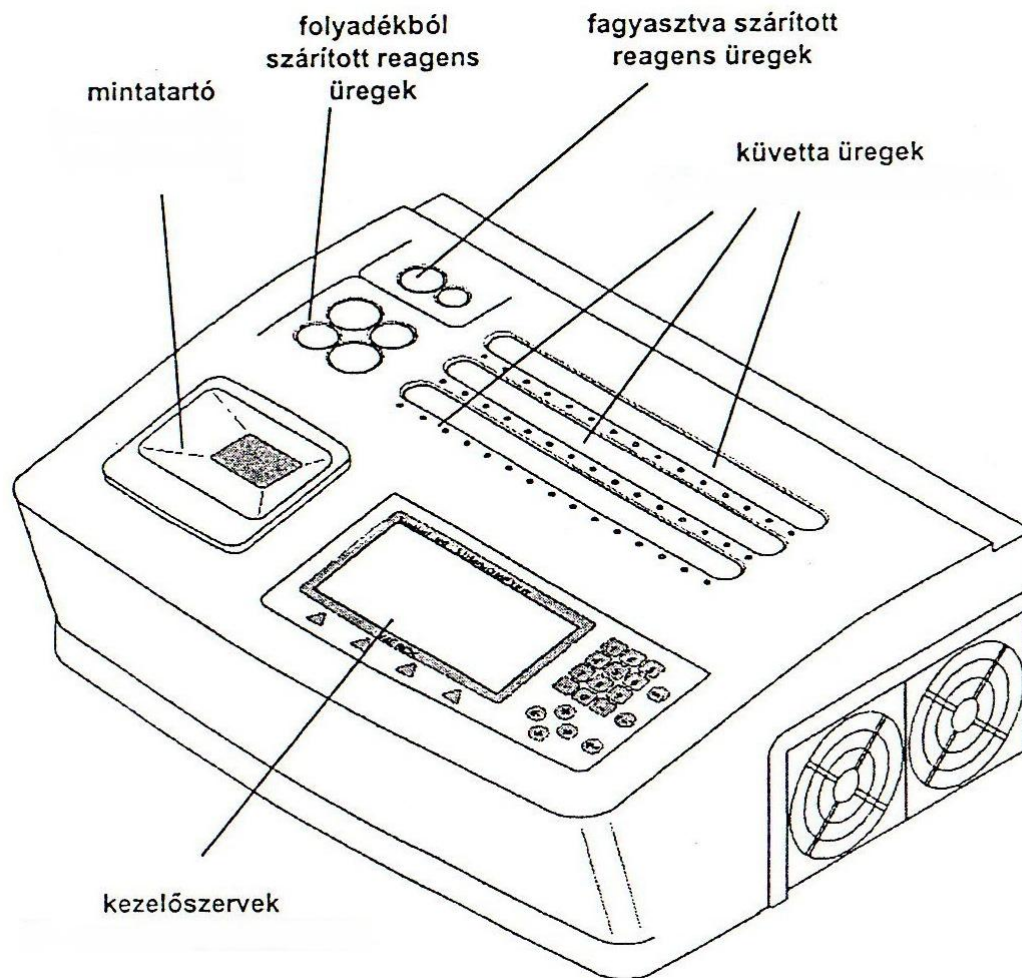
- természetes élőhelye a sós víz
- a fénykibocsátás tulajdonképpen „fizetség” egy kölcsönösen előnyös szimbiotikus kapcsolatban
- *Euprymna scolopes* nevű tintahal fajjal áll fenn

Bakteriális lumineszcencia

- $\text{FMNH}_2 + \text{O}_2 + \text{RCHO} \rightarrow \text{luc. hu}(490\text{nm}) + \text{FMN} + \text{H}_2\text{O} + \text{RCOOH}$ (Láng, 2002)
- **FMNH₂**: flavinmononukleotid redukált formája
- **RCHO**: luciferin, fénykibocsátó hosszú láncú alifás aldehid
- **luc.** = *luciferáz*: bakteriális enzim, vegyes funkciójú oxigenáz
- **hu**: emittált fényenergia
- **FMN**: flavinmononukleotid
- **RCOOH**: hosszú láncú szerves sav

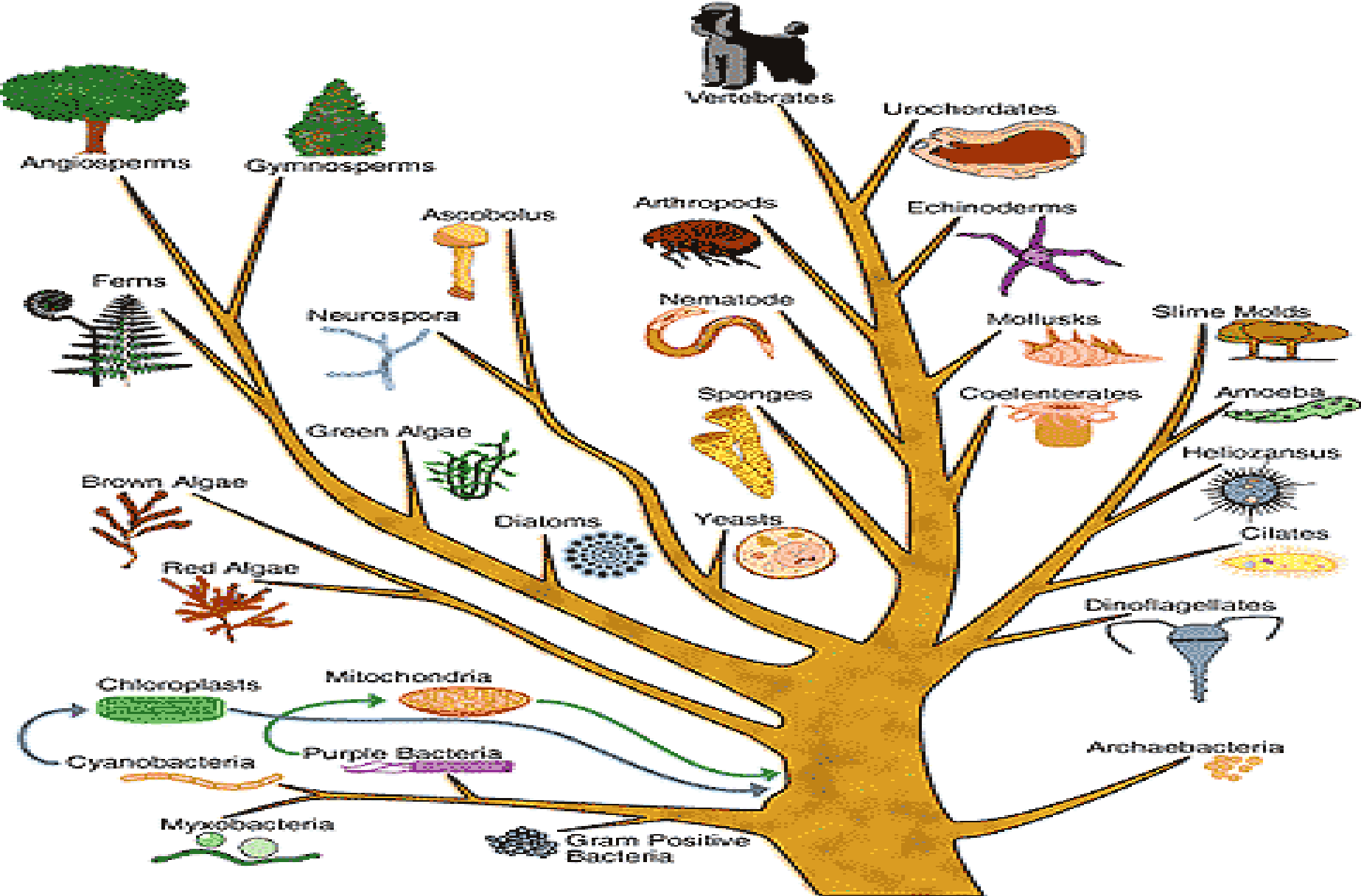


ToxAlert100™

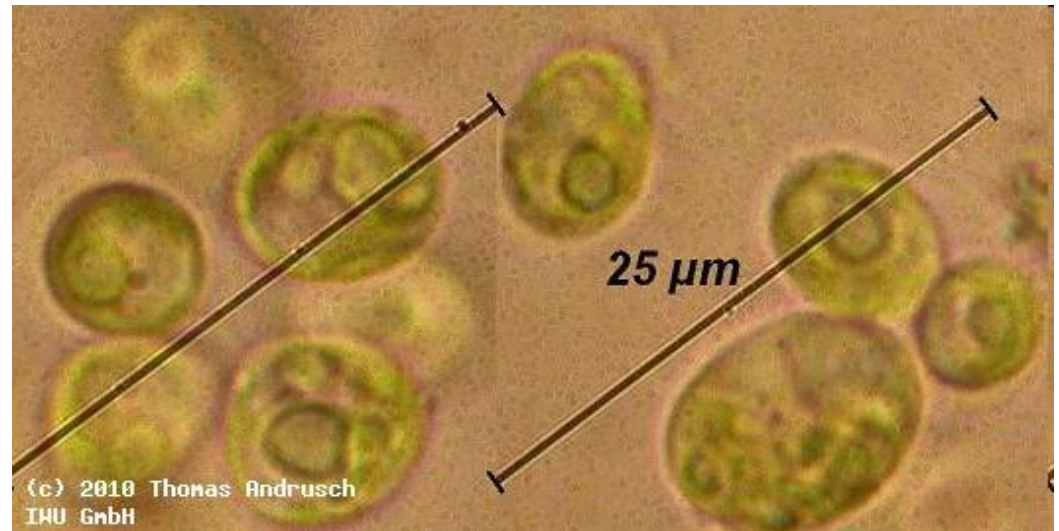
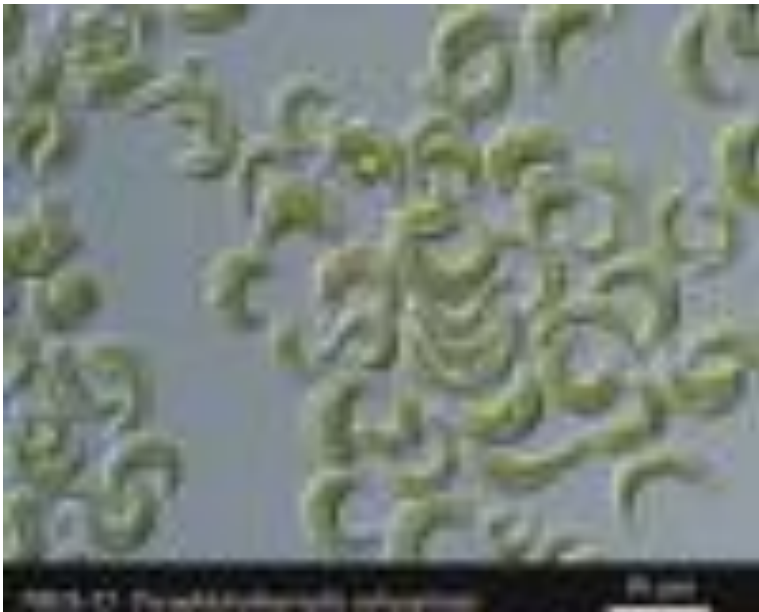


Az in-vivo biolumineszcencia a sejt életképességének jellemzője, közvetlenül kötődik az életképességhez, metabolikus állapothoz. A mérgező anyag változásokat idéz elő a sejt állapotában – sejtfal, sejtmembrán, elektrontranszport-rendszer, enzimek, a citoplazma alkotói – amelyek gyors eredménye a biolumineszcencia csökkenése.

Növények



- *Pseudokirchneriella subcapitata* (*Selenastrum capricornutum*)
- *Desmodesmus subspicatus* (*Scenedesmus subspicatus*)



Az OECD alga növekedés-gátláson alapuló teszt (OECD Test No. 201)



- Exponenciális növekedési fázisban lévő algatenyészetet tesszük ki a vegyi anyag hatásának 72 órán keresztül, öttagú hígítási sorban, 3–3 párhuzamossal.
- 60–120 $\mu\text{Em-2s-1}$ intenzitású fluoreszcens fénnel világítást kell biztosítani.
- Az algatenyészet sejtkoncentrációját naponta kell mérni; a számlálás történhet mikroszkópos sejtszámlálással, vagy elektronikus részecskeszámlálóval, esetleg optikai denzitás mérésével vagy klorofill-tartalom alapján

Békalencse (*Lemna minor* vagy *Lemna gibba*)



A. ANDMAT, LEMNA MINOR L. B. KUPANDMAT, L. GIBBA L.
 C. KORSANDMAT, L. TRISULCA L.
 D. STORANDMAT, SPIRODELA POLYRRHIZA SCHLEID.

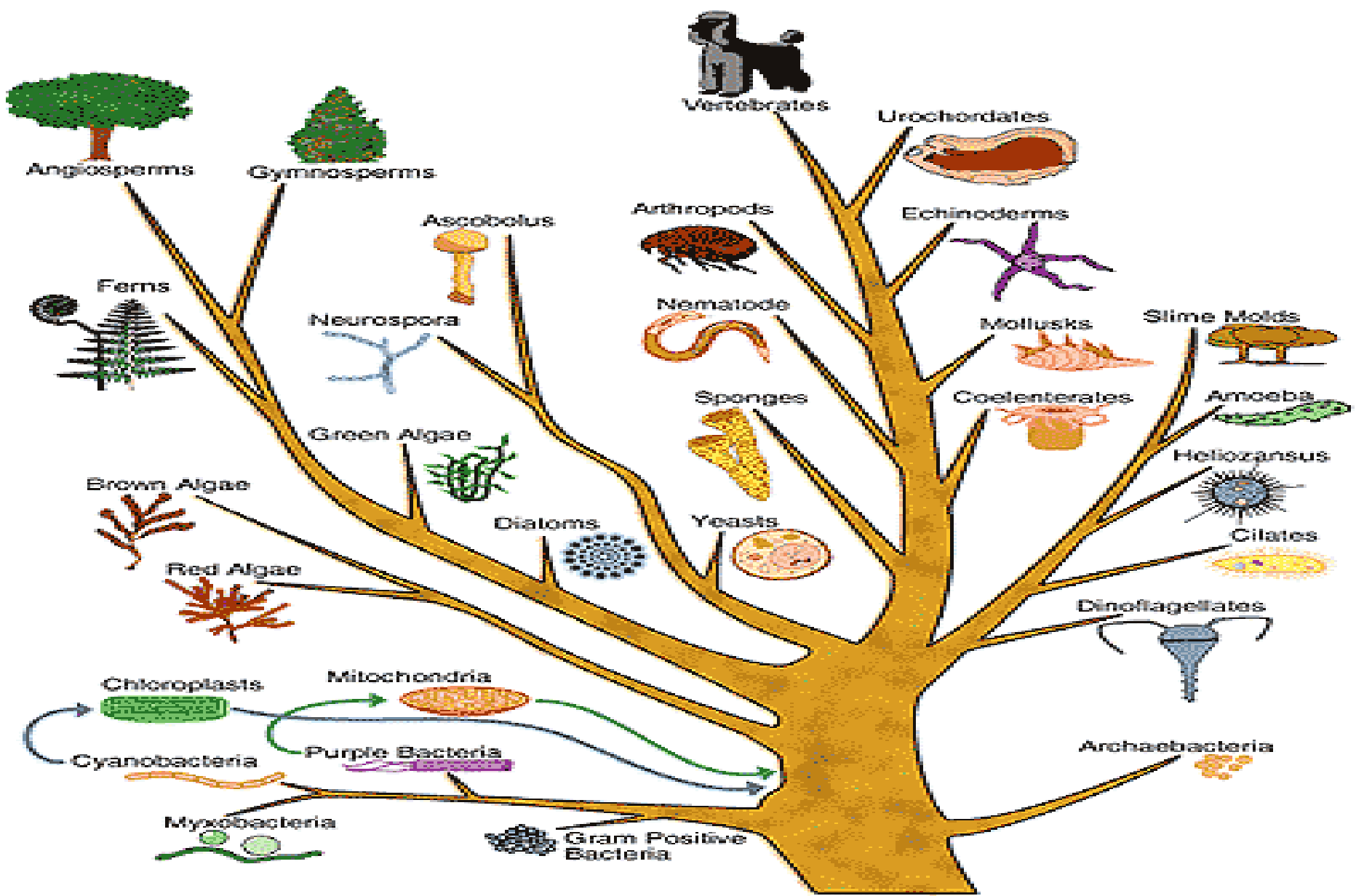
OECD Lemna teszt

A teszt célja, hogy a vizsgálandó vegyi anyag koncentrációja és a vegetatív növekedésre gyakorolt hatás közti kapcsolatot feltárja.



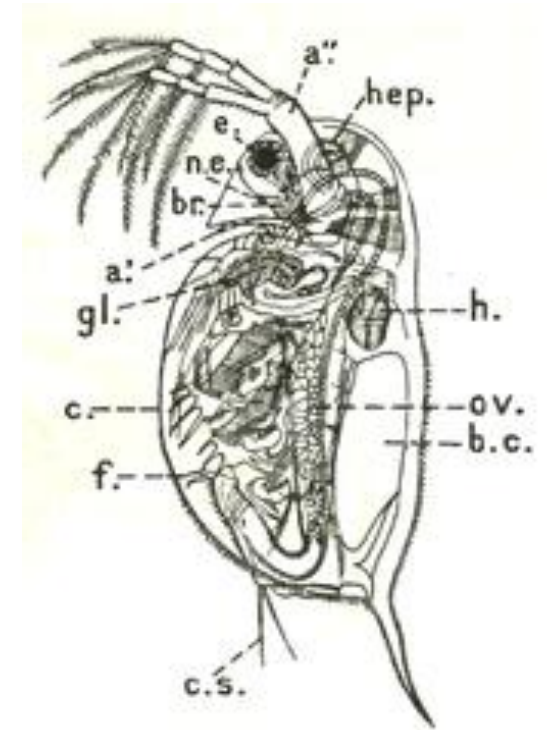
- növekedési gátláson alapuló teszt
- a tesztelendő vegyi anyag különböző koncentrációjú oldataiban, 7 napon keresztül
- mért paraméterek: a levélkeszám, de emellett gyakori tesztelési végpont a teljes levélfelület, a száraz súly és a nedves súly is

Állatok



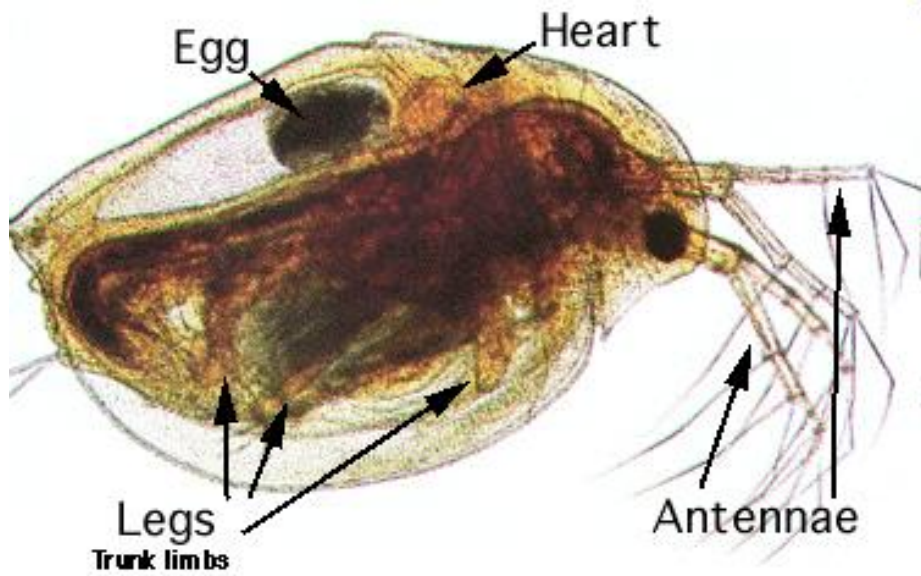
Ágascsapúrák (Cladocera)

- Több száz faj a csoportban
- Testüket jobbról és balról egy-egy héj veszi körül, melyet izom tart össze
- 2 pár csáp erősen fejlett, elágazó szerv
- Ugráló mozgás
- Bélcsatornájuk kevésbé tagolt, vízből szűrik táplálékukat (algák)
- Kopoltyúval lélegeznek (lábakon van)



Daphnia, female. a', antennule; a'', antenna; h.c., brood-chamber; br., brood-chamber; e., compound eye; n.e., nauplius eye; c.s., caudal setae; c., margin of carapace; gl., maxillary gland; h., heart; hep., hepatic diverticulum of gut; ov., ovary. (After Claus and Grobben.)

- *Daphnia magna*,



- *Daphnia pulex*

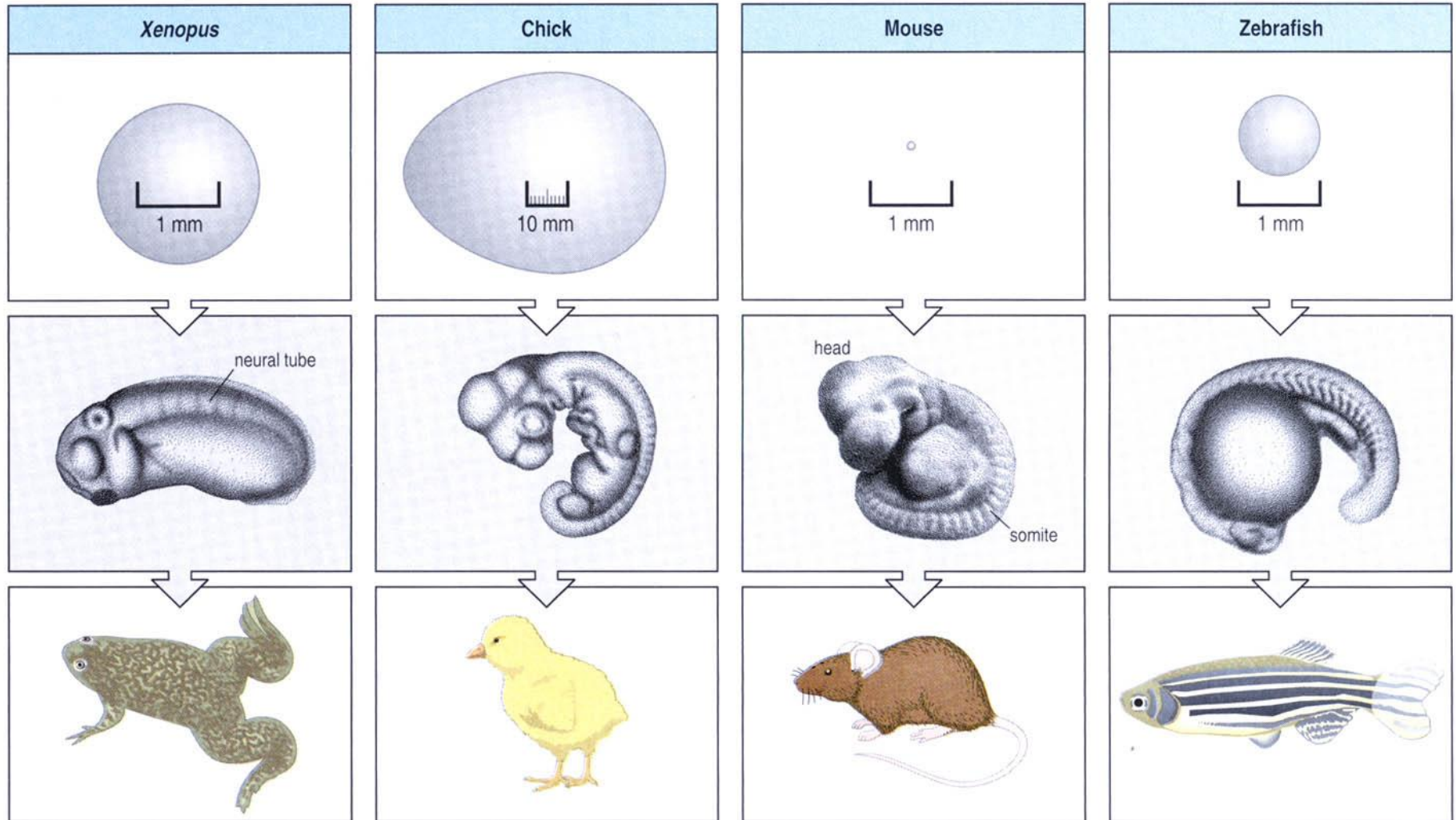


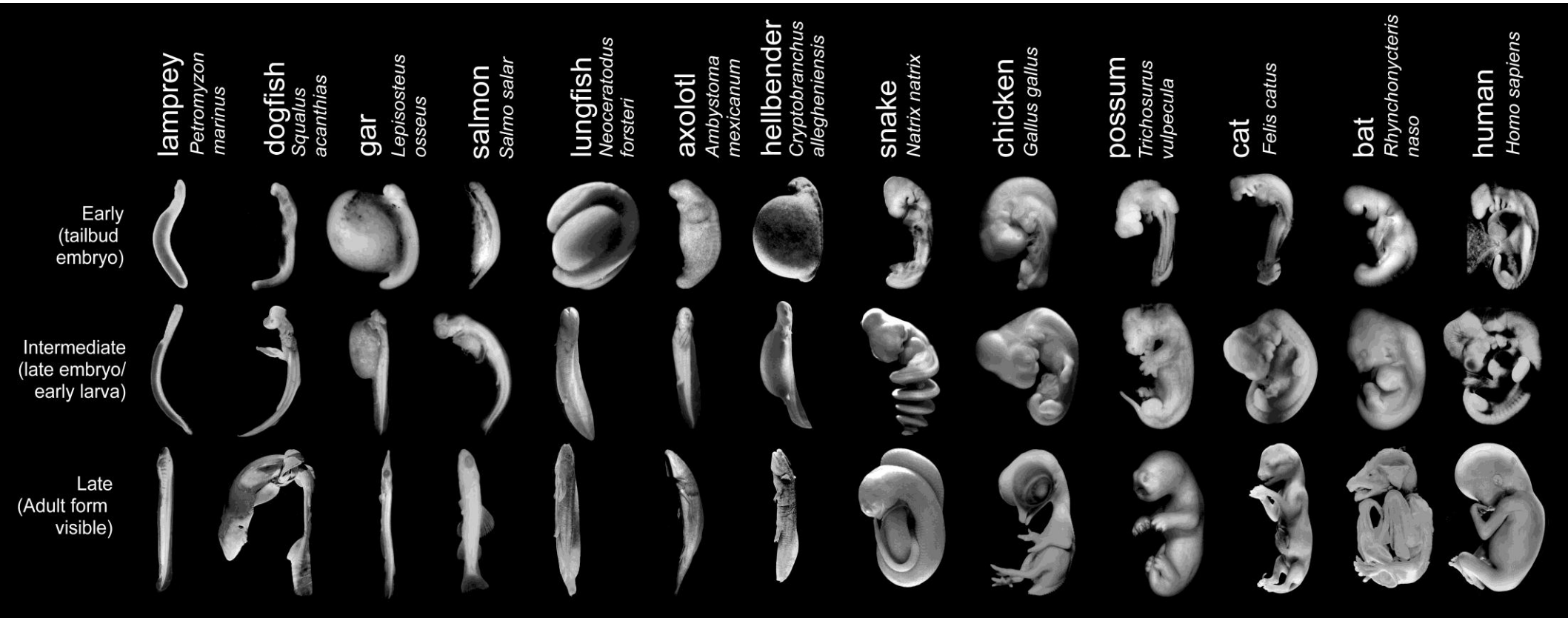
OECD Test No. 202: Daphnia sp., Akut immobilizációs teszt

- Fiatal – legfeljebb 24 órás – Daphniákkal teszteljük a vegyi anyag hatását 48 órán keresztül.
- A kísérlet elején és végén a hőmérsékletet, a pH-t és az oldott oxigénszintet meg kell határozni.
- Minimum öttagú hígítási sorban. Minden koncentrációnál 20–20 Daphniát tesztelünk négy csoportra osztva, 5–5 állattal.
- Egy-egy állat 2 ml tesztoldatot igényel, így minimum 10 ml vegyi anyag oldatot kell biztosítani tesztedényenként.
- A mozgásképtelen állatok számát 24 és 48 óra elteltével rögzítjük, és a kontroll mintához viszonyítva számítjuk a gátlási százalékot.

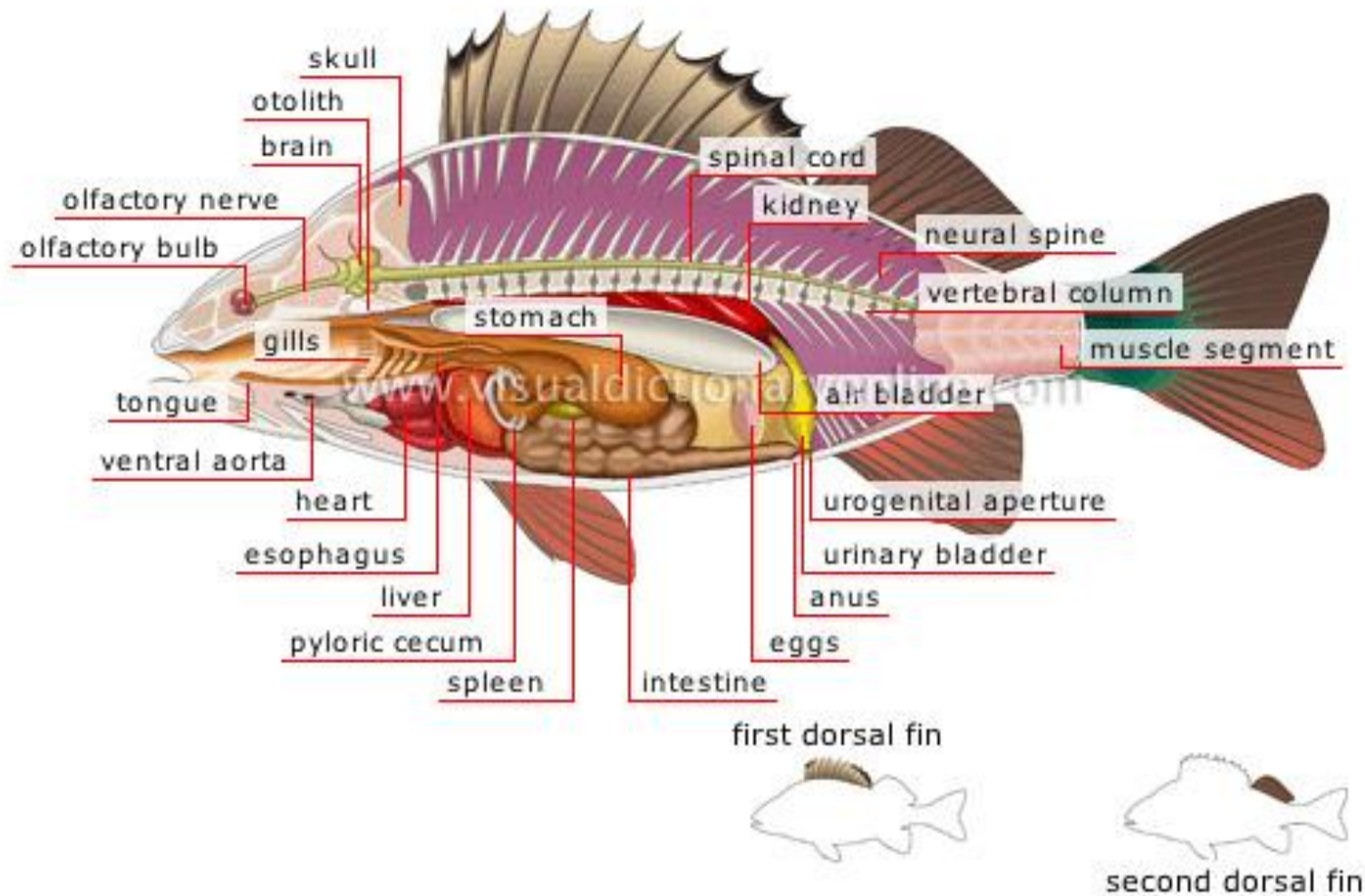


Gerinces modellállatok

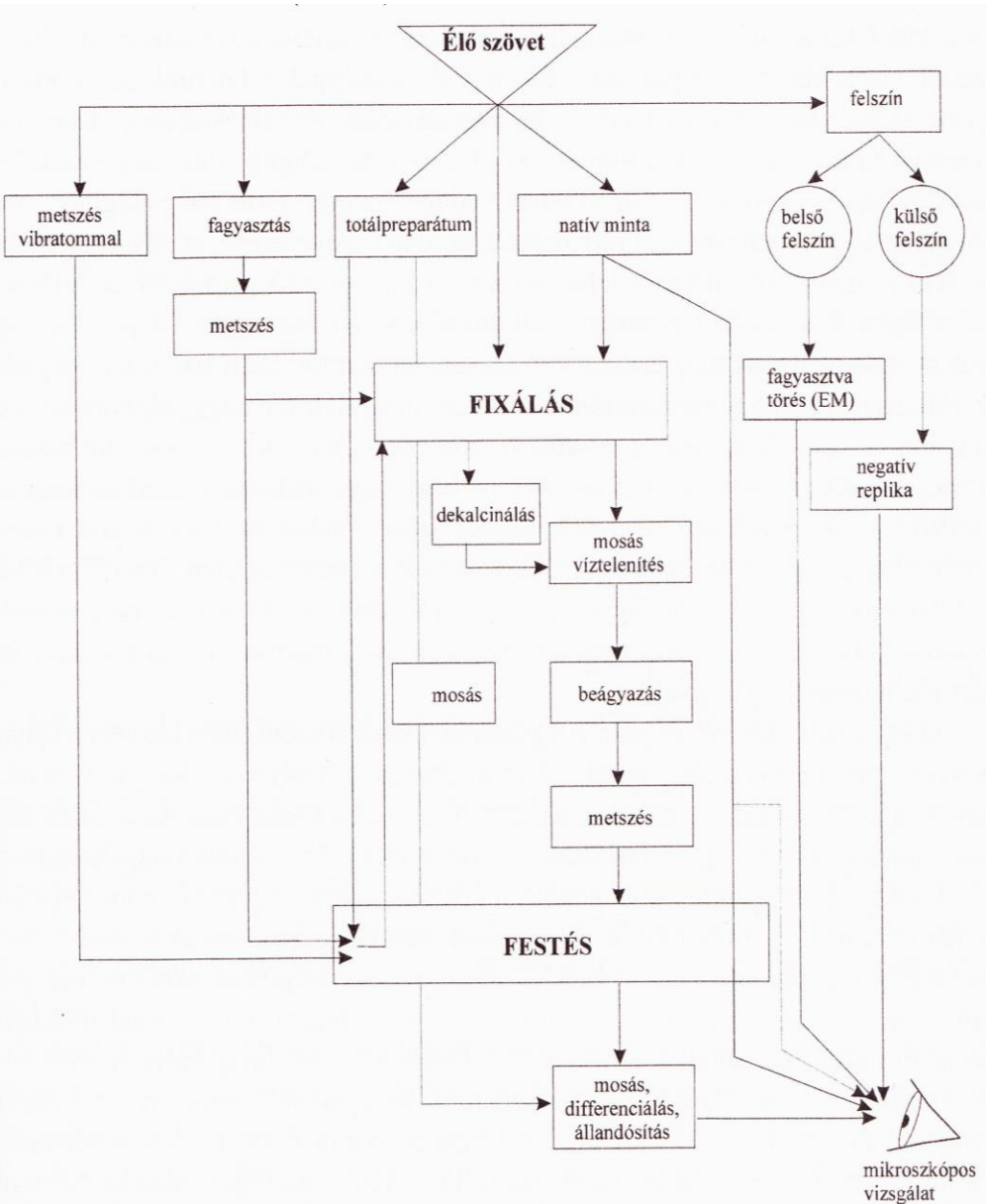




Halak



Szöveti metszetek a mérgezéseknek leginkább kitett szervekről



Hematoxin-eozin festés:

A sejtmagok, a baktériumok, a porcszövet és nyákok kékre, a vörösvértestek narancsvörösre, minden egyéb szövet rózsaszínűre festődik.

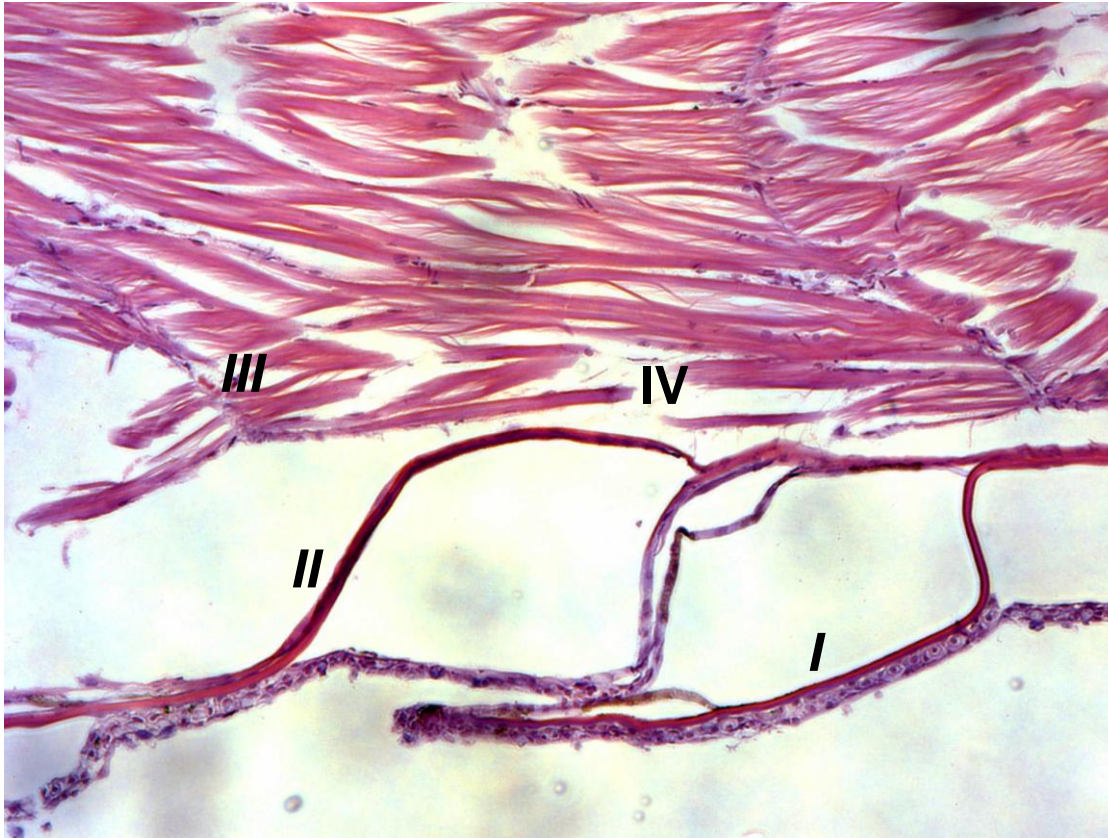
PAS- (periodic acid-Schiff) festés:

A makromolekuláris szénhidrát komponenseket festi meg. A glikogén, fibrinoid, hámnyák, porcalapállomány, amiloid, kolloid, cellulóz, bazális membránok, a hipofízis bazofil sejtjei és a gombák ibolyásvörösre, a kollagénrostok halványvörösre, és a sejtmagok kékre színeződnek.

Grohe – Perls-féle eljárás (1854, 1867):

A ferrivasat tartalmazó elemek kékre, a sejtmagok vörösre, a citoplazmák rózsaszínűre színeződnek.

Bőr



***Tízszeres nagyításban készült hosszmetzeti felvétel a bőrről
I.: normális vastagságú hámréteg, II.: pikkely, III.: harántcsíkt izomszövet,
IV.: a 10 %-os formalin károsító hatása***

Bőr II



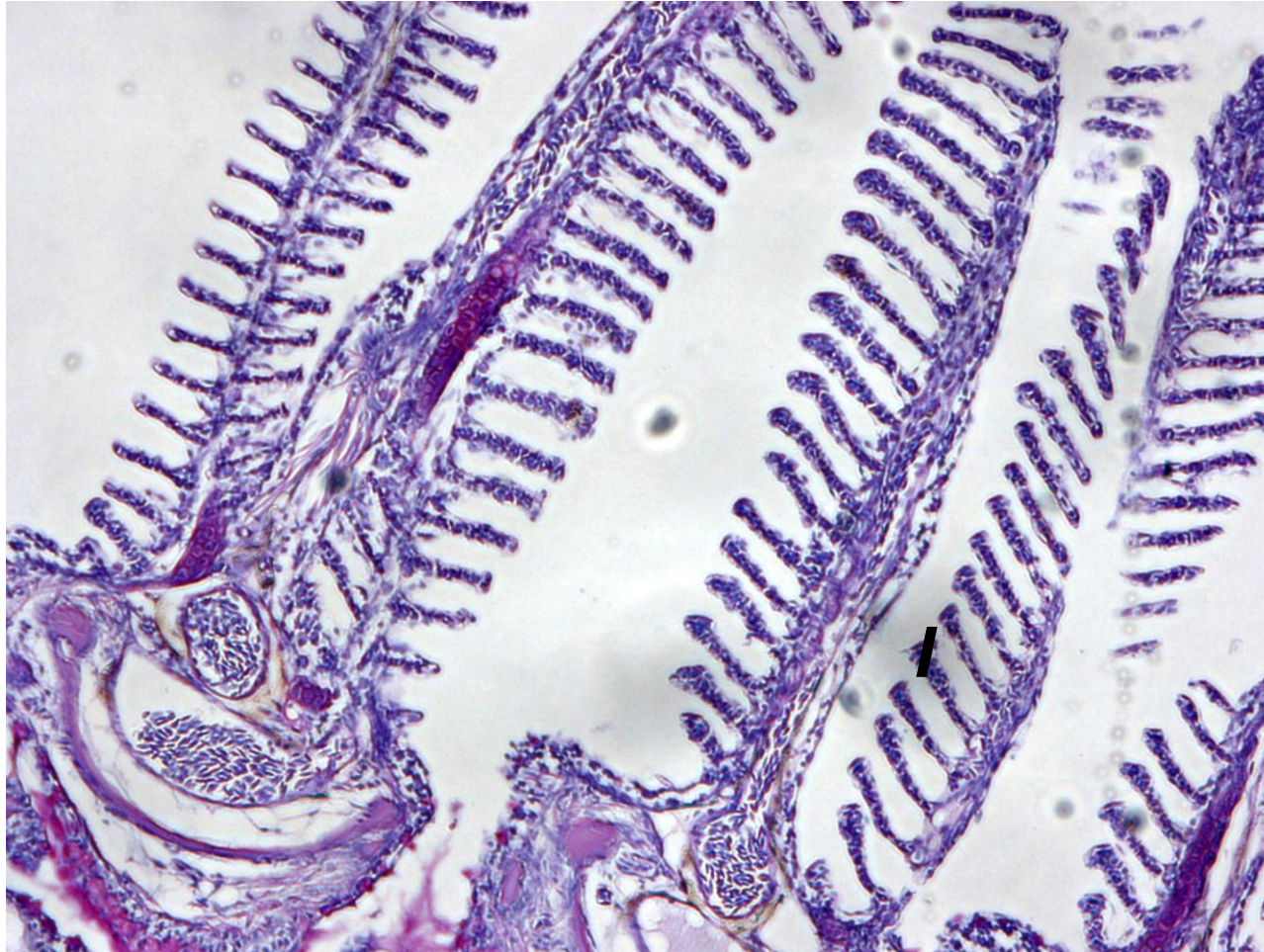
***Tízszeres nagyításban készült hosszmetzeti felvétel a bőrről
I.: hámréteg a pikkelyeken, II.: zsírszövet***

Kopoltyú



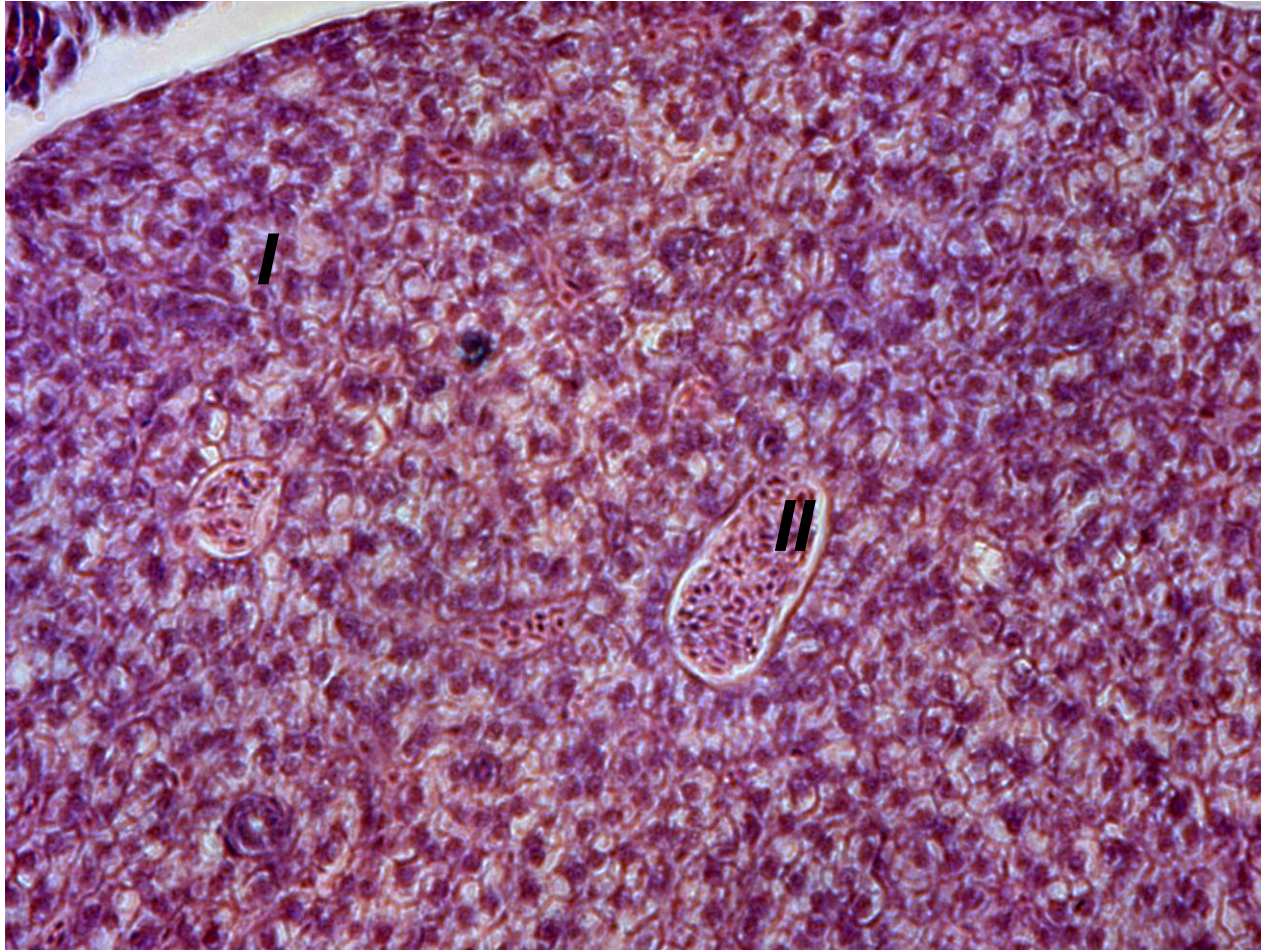
**Tízszerezes nagyításban készült hosszmetzeti felvétel a kopoltyúról
I.: kopoltyúívek, II.: kopoltyúlemezek egyrétegű laphámja**

Kopoltyú II



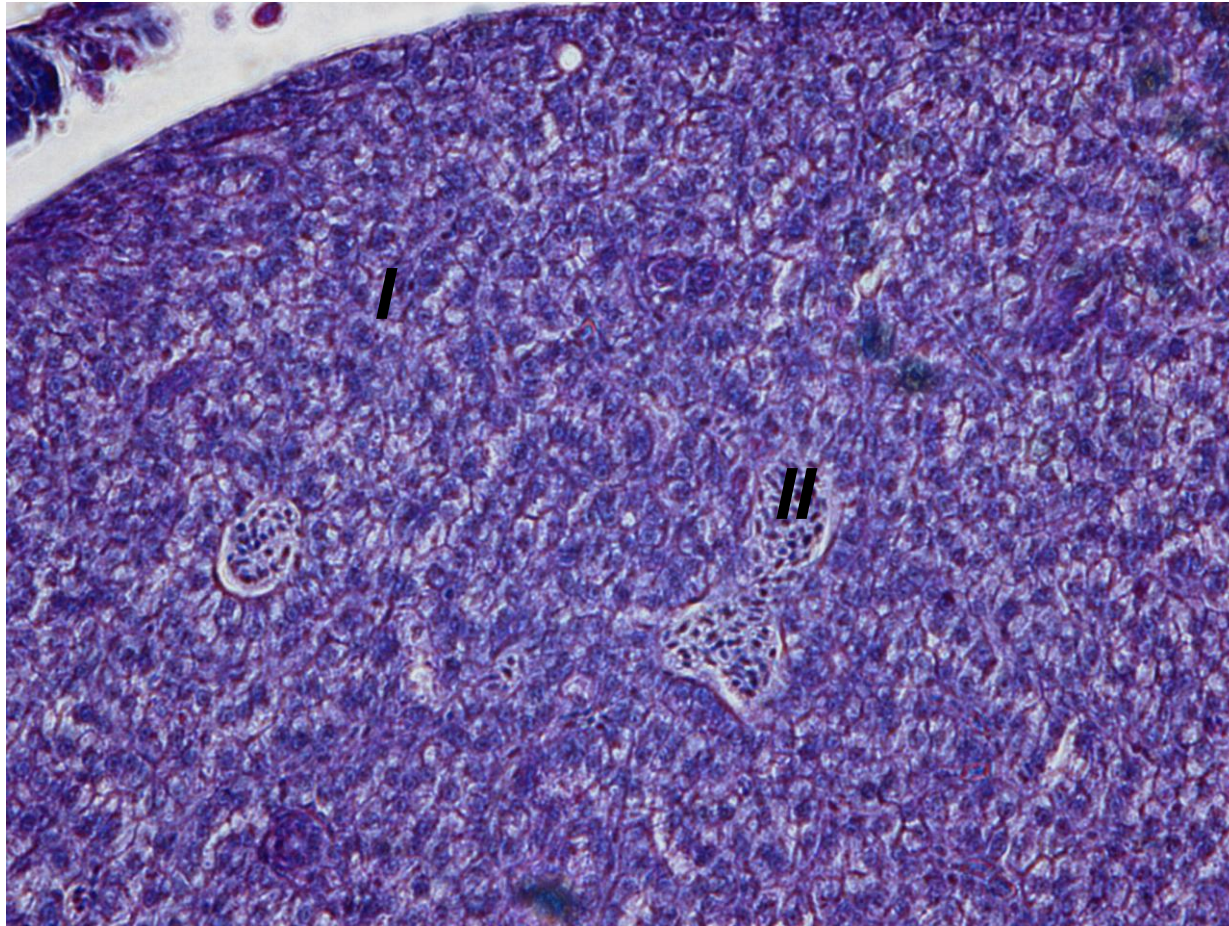
***Tízszeres nagyításban készült hosszmetzeti felvétel a kopoltyúról
I.: légzőredők egyrétegű laphámja***

Máj



***Húszszoros nagyításban készült hosszmetzeti felvétel a májról
I.: májsejtek, II.: vérér***

Máj II



***Húszszoros nagyításban készült hosszmetzeti felvétel a májról
I.: májsejtek, II.: vérér***

Laboratóriumi kísérletekhez használt fontosabb halfajok

- Paradicsomhal (*Macropodus opercularis*)
- Sziámi harcoshal (*Betta splendens*)
- Mexikói kardfarkúhal (*Xiphophorus helleri*)
- Platty (*Xiphophorus maculatus*)
- Szivárványos guppi (*Poecilia reticulata*)
- Rózsás díszmárna (*Barbus conchoniensis*)
- Aranyhal (*Carassius auratus*)
- Barlangi vaklazac (*Astyanax mexicanus*)
- Ponty (*Cyprinus carpio*)
- Nílusi tilápia (*Oreochromis niloticus*)
- Háromtűskés pikó (*Gasterosteus aculeatus*)
- Édesvizi gömbhalak (*Tetraodon nigroviridis*, *Takifugu rubripes*)
- Szivárványos pisztráng (*Oncorhynchus mykiss*)
- Csíkfélék (*Misgurnus* sp.)
- Afrikai harcsa (*Clarias gariepinus*)
- Medaka (*Orizias latipes*)
- Zebradánió (*Danio rerio*)
- Killihal (*Fundulus heteroclitus*)

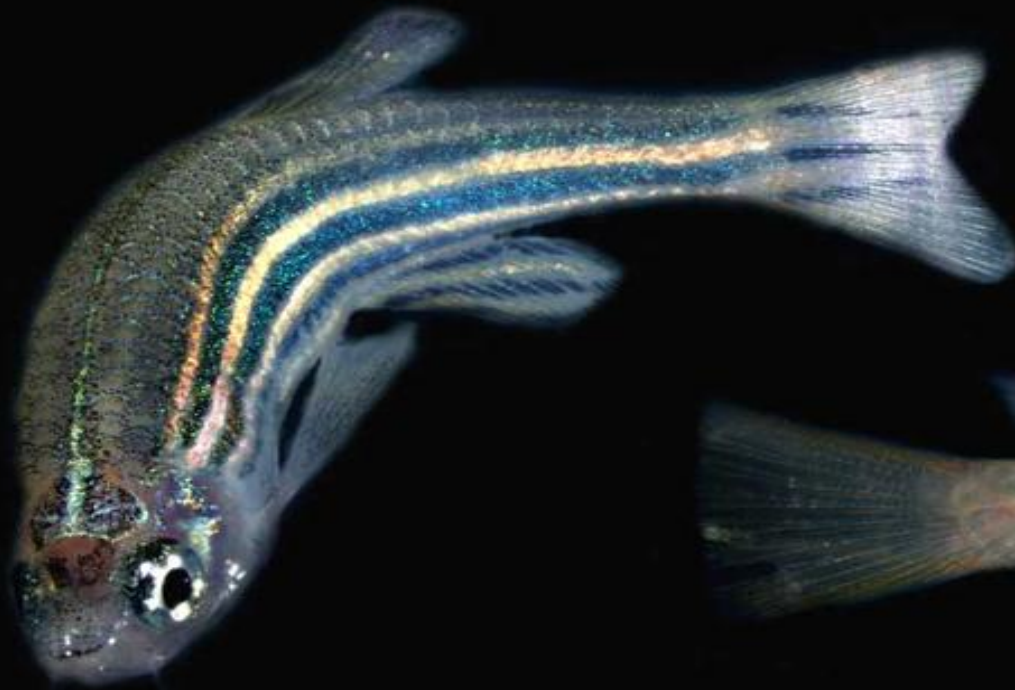
MSz által javasolt fajok

Halfaj	A tesztelési hőmérsékleti tartomány, °C	A halak javasolt testhossza, cm
Szivárványos pisztráng (<i>Salmo gairdneri</i> Richardson), apróállatevő, ragadozó	13-17	5,0±1,0
Fogassülő (<i>Stizostedion lucioperca</i> L.), ragadozó	18-20	5,0±1,0
Szivárványos ökle (<i>Rhodeus sericeus amarus</i> Bloch), apróállatevő	18-23	3,0±1,0
Ezüstkárász (<i>Carassius auratus</i> L.), vegyes táplálkozású	18-23	4,0±1,0
Ponty (<i>Cyprinus carpio</i> L.), vegyes táplálkozású	18-23	4,0±1,0
Harcsa (<i>Silurus glanis</i> L.), ragadozó	20-24	5,0±1,0
Amúr (<i>Ctenopharyngodon idella</i> Cuv. et Val.), növényevő	20-24	5,0±1,0
Fehér busa (<i>Hypophthalmichthys molitrix</i> Cuv. et Val.), planktonevő	20-24	5,0±1,0
Szivárványos guppi (<i>Poecilia reticulata</i> Peters), apróállatevő	23-25	2,0±1,0

+ Zebradánió

OECD által javasolt fajok

Recommended species	Recommended test temperature range (°C)	Recommended total length of test fish (cm) ¹
<u>Brachydanio rerio</u> (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) Zebra-fish	21 - 25	2.0 ± 1.0
<u>Pimephales promelas</u> (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque) Fathead Minnow	21 - 25	2.0 ± 1.0
<u>Cyprinus carpio</u> (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus) Common carp	20 - 24	3.0 ± 1.0
<u>Oryzias latipes</u> (Teleostei, Cyprinodontidae) (Temminck and Schlegel) Ricefish	21 - 25	2.0 ± 1.0
<u>Poecilia reticulata</u> (Teleostei, Poeciliidae) (Peters) Guppy	21 - 25	2.0 ± 1.0
<u>Lepomis macrochirus</u> (Teleostei, Centrarchidae) (Rafinesque) Bluegill	21 - 25	2.0 ± 1.0
<u>Oncorhynchus mykiss</u> (Teleostei, Salmonidae) (Walbaum) Rainbow trout	13 - 17	5.0 ± 1.0



Danio rerio
(Cypriniformes)



Oryzias latipes
(Beloniformes)

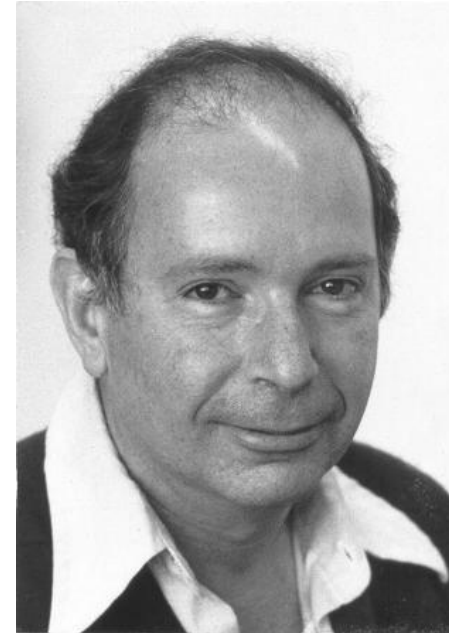


Tetraodon nigroviridis
Takifugu rubripes
(Tetraodontiformes)

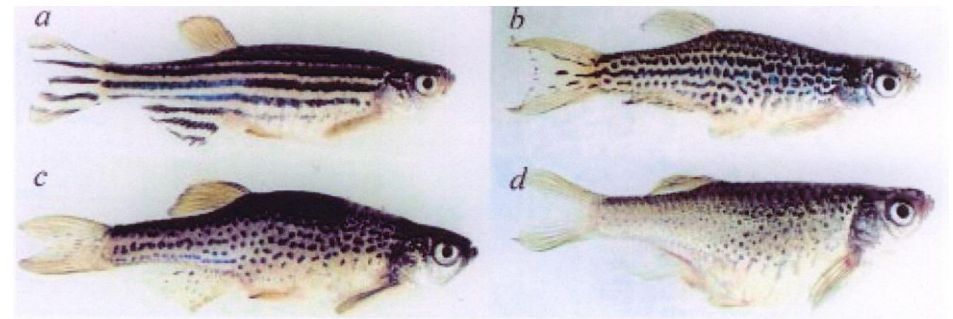
Zebradánió (*Danio rerio*, Hamilton-Buchanan 1822) I.

- India, Burma, Maláj-félsziget, Szumátra
- 22-24°C (27 °C)
- Nem igényesek a víz kémiai összetételére
- Falánk mindenevők
- Csapathal
- 100-150 ikraszem/ hét (200-400)
- Az ikrahéj nem ragadós, átlátszó
- 48-72 órával a termékenyülés után kikelnek a lárvák
- 3 hónap alatt ivaréretté válnak

- Intenzív rendszerekben, komplett protokollok szerint nevelik

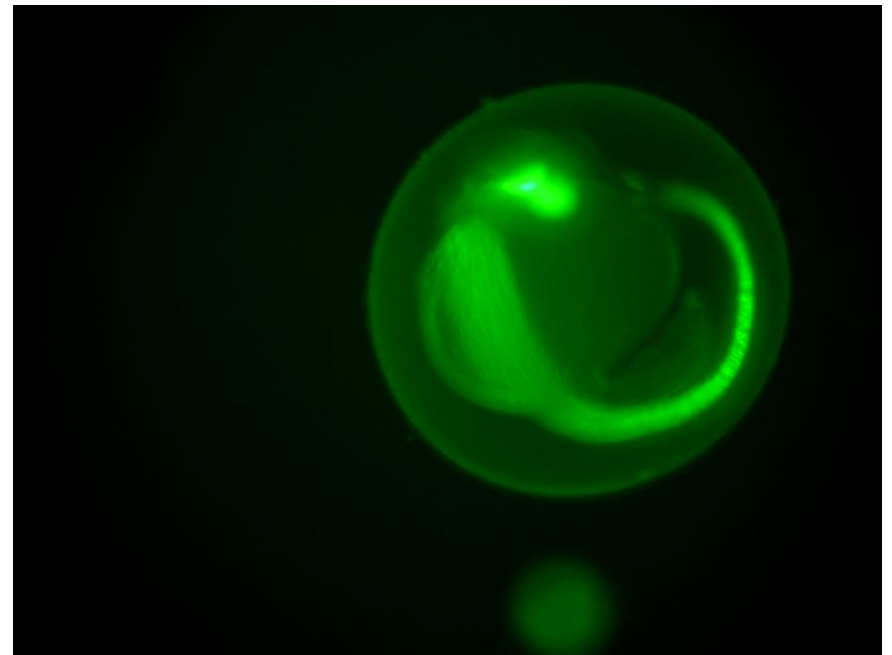


Streisinger György



Zebradánió (*Danio rerio*, Hamilton-Buchanan 1822) II.

- Genomméret: 1 700 000 000 bp
- Kromoszómaszám: 50
- >4500 mutáns vonal
- Majdnem teljes génkönyvtár
- Kezdetben csak fejlődésbiológiai kutatások
- Kimérakészítés, immunogenetikai vizsgálatok
- Andro- és ginogenezis
- Transzgenikus hal előállítás



A zebradánióon végzett kutatási irányok napjainkban

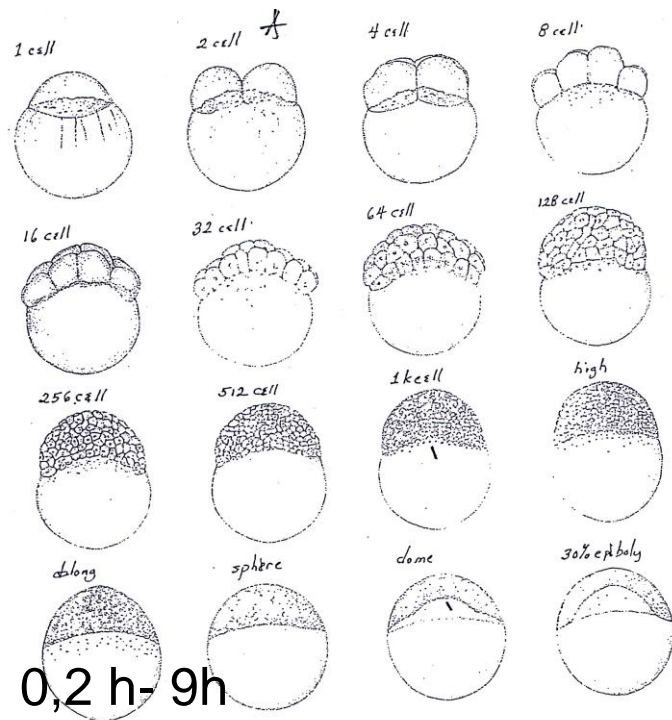
- Környezettoxikológiai vizsgálatok
- A különböző szervek, szövetek fejlődési rendellenességeinek, betegségeinek vizsgálata
- Lipidmetabolizmus vizsgálata
- Tumorbiológiai kutatások
- Fejlődésbiológia
- Öregedésvizsgálat
- Gyógyszerhatásvizsgálatok a humángyógyászatban

Table 2

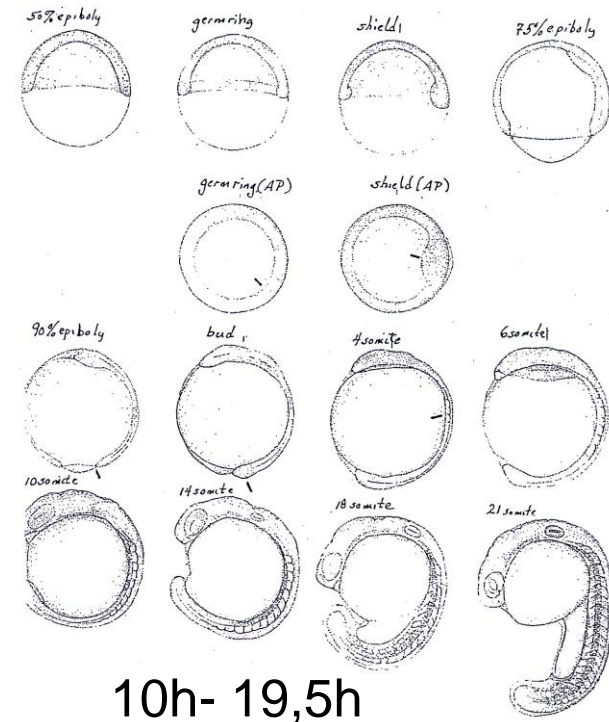
Pharmacological comparisons: observed action of selected drugs in zebrafish.

Drug	Action
Aspirin	Arachidonic acid-induced aggregation and agonist-induced ATP release
Warfarin and protac	Spontaneous bleeding, PT/APTT prolongation
Sodium nitroprusside	Vasodilation
L-NAME	Vasoconstriction
Carbachol	Tachycardia; blocked by M ₂ acetylcholine receptor knockdown
Atorvastatin	Decreased cholesterol synthesis
Indomethacin	Prostaglandin inhibition, prolonged bleeding time, reduced thrombocyte aggregation
Prednisolone	Anti-inflammatory action
5-amino salicylic acid	Anti-inflammatory action
NS-398 (cyclooxygenase-2 inhibitor)	Prostaglandin inhibition, normal coagulation parameters
Terfenadine	QT prolongation
Diazepam	Anti-convulsant action
Etidronate	Anti-osteoporotic action

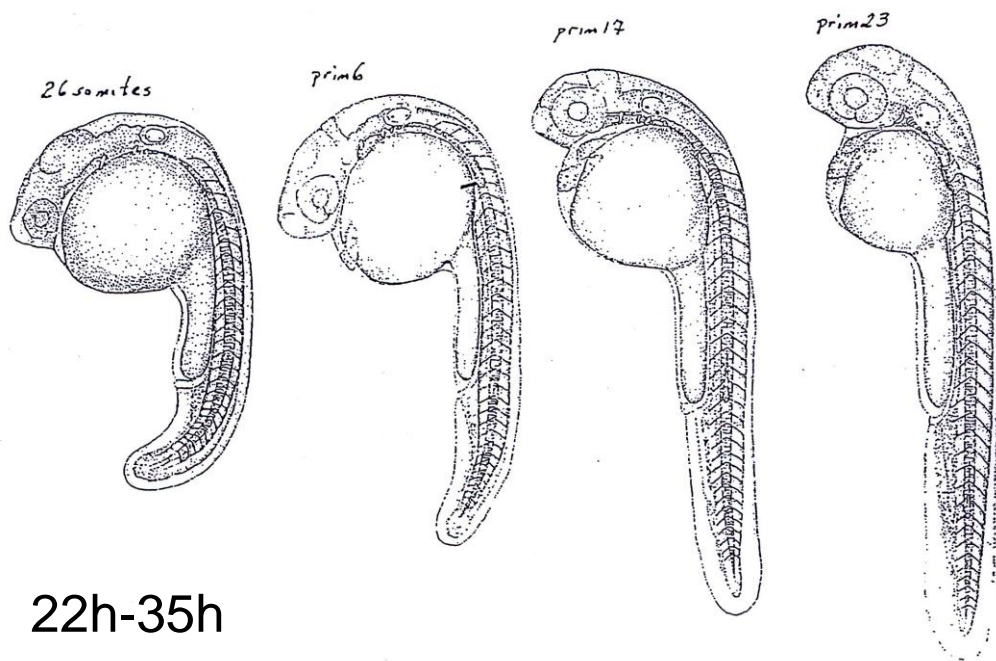
L-NAME, nitro-L-arginine methyl ester.



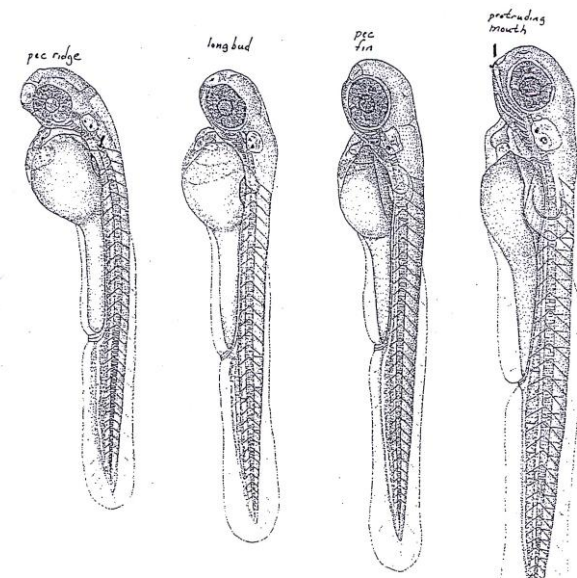
0,2 h- 9h



10h- 19,5h



22h-35h



42h-72h — The Zebrafish Book 1995

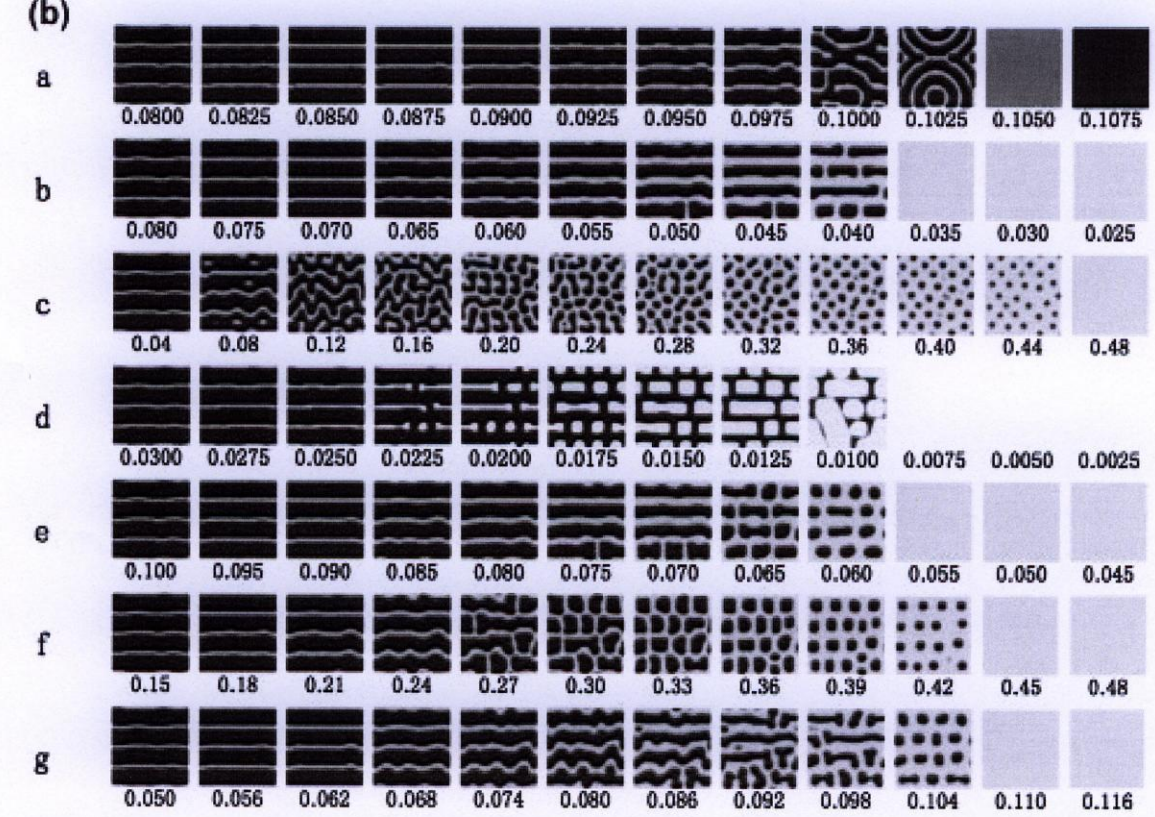
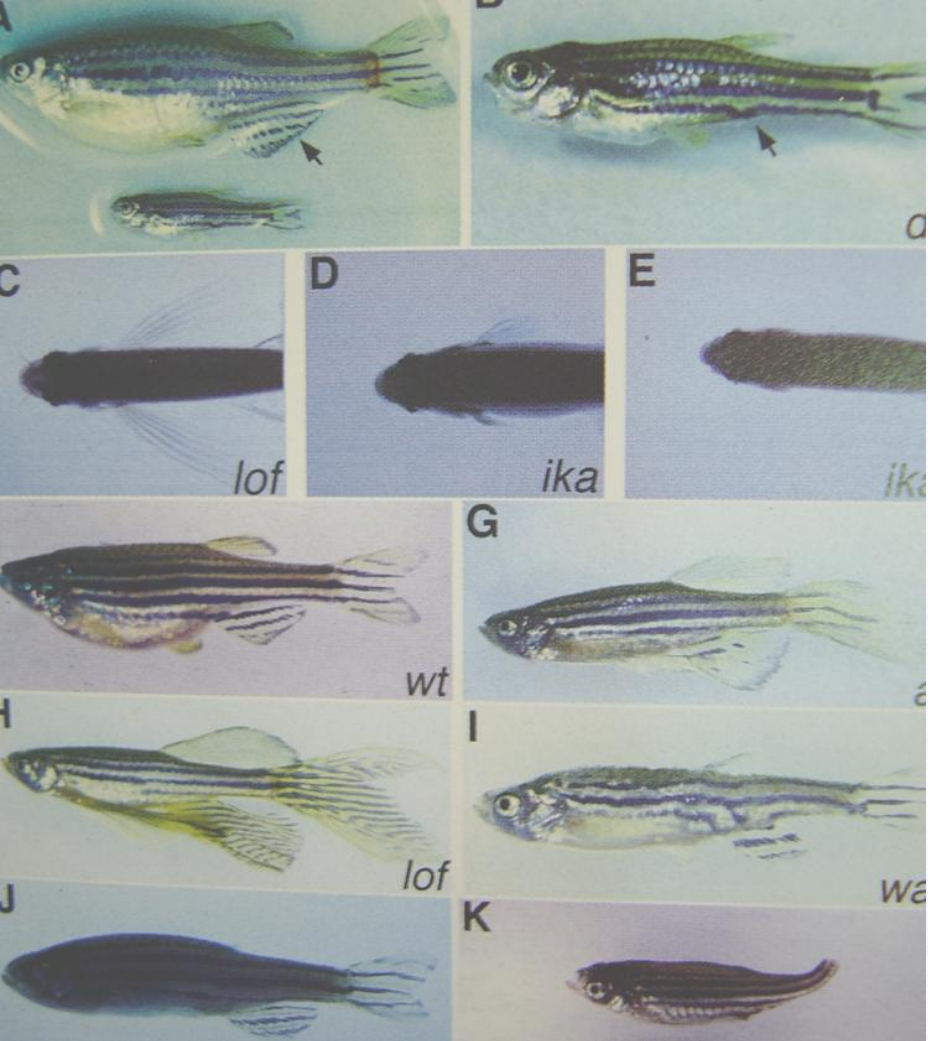


Fig. 3. (a) A schematic representation of the reaction-diffusion system. (b) Results of a simulation study. The left most columns are standard simulations corresponding to the wild type ($a = 0.08, b = 0.08, c = 0.04, d = 0.03, e = 0.1, f = 0.15, g = 0.05$ and $P = 0.5$). In each line, one of the parameter is changed sequentially. Only the direction that the white areas come wider is shown. Field size is 64×64 . The concentration of activator is shown by gray scale. (light; high concentration, dark; low concentration) The starting pattern is a random pattern with three thin lines. Cells of relatively high activator concentration were put to form three horizontal lines. In spite of the pattern variety in adult, all the mutant fish have the identical juvenile pattern of three thin lines of melanocytes. 20 000 iterations used. To simulate the body growth, the diffusion constants are linearly decreased to a half of the starting value. All the details of simulations and the software used will be open at our HP when this paper is published.

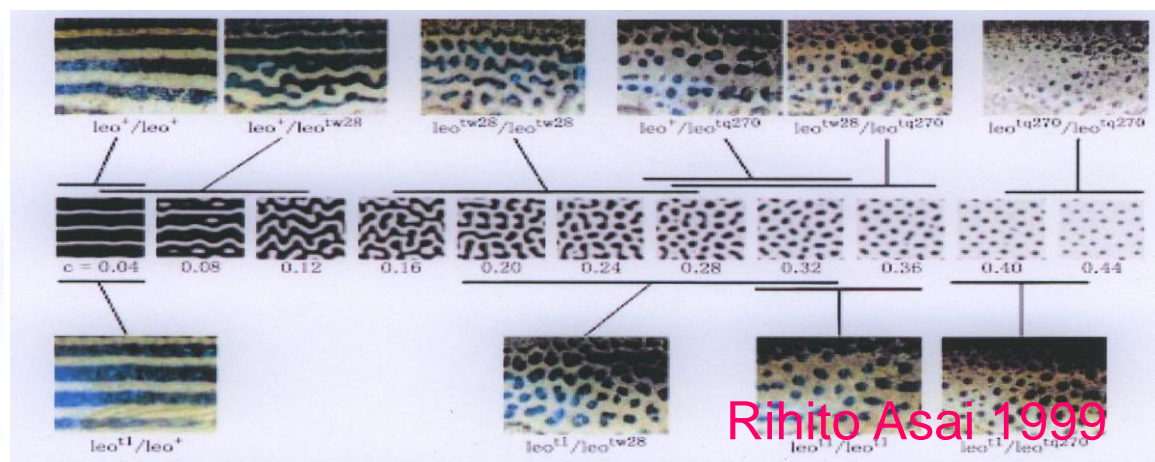
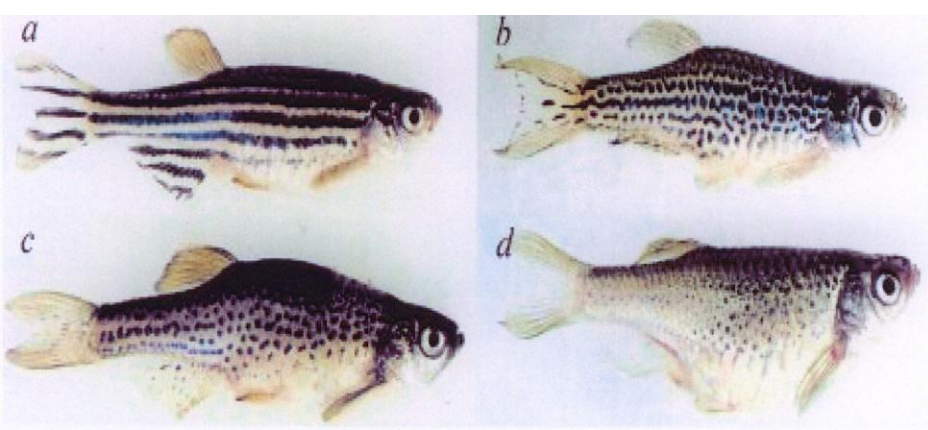
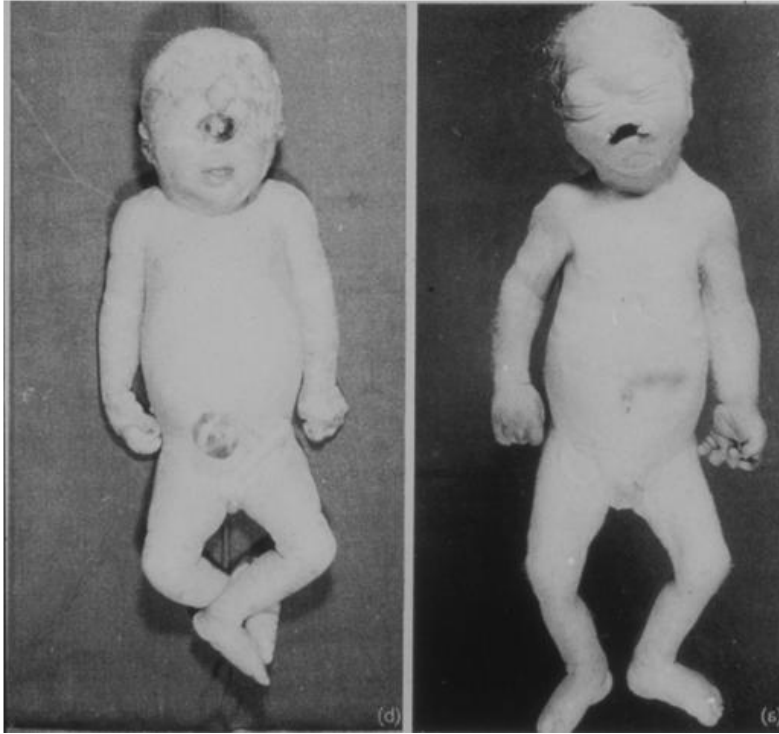


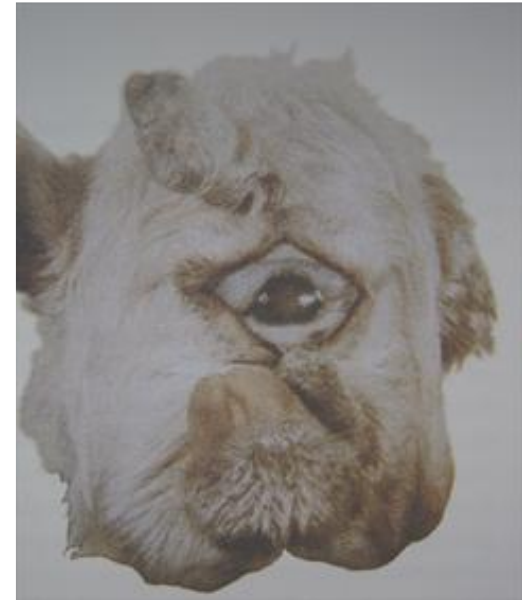
Fig. 4. Relationship between the mutant pattern and the c value of the RD system. Pictures are taken from the middle part of the fully-grown females. Horizontal bar shows the fluctuations within the genotypes.

Rihito Asai 1999

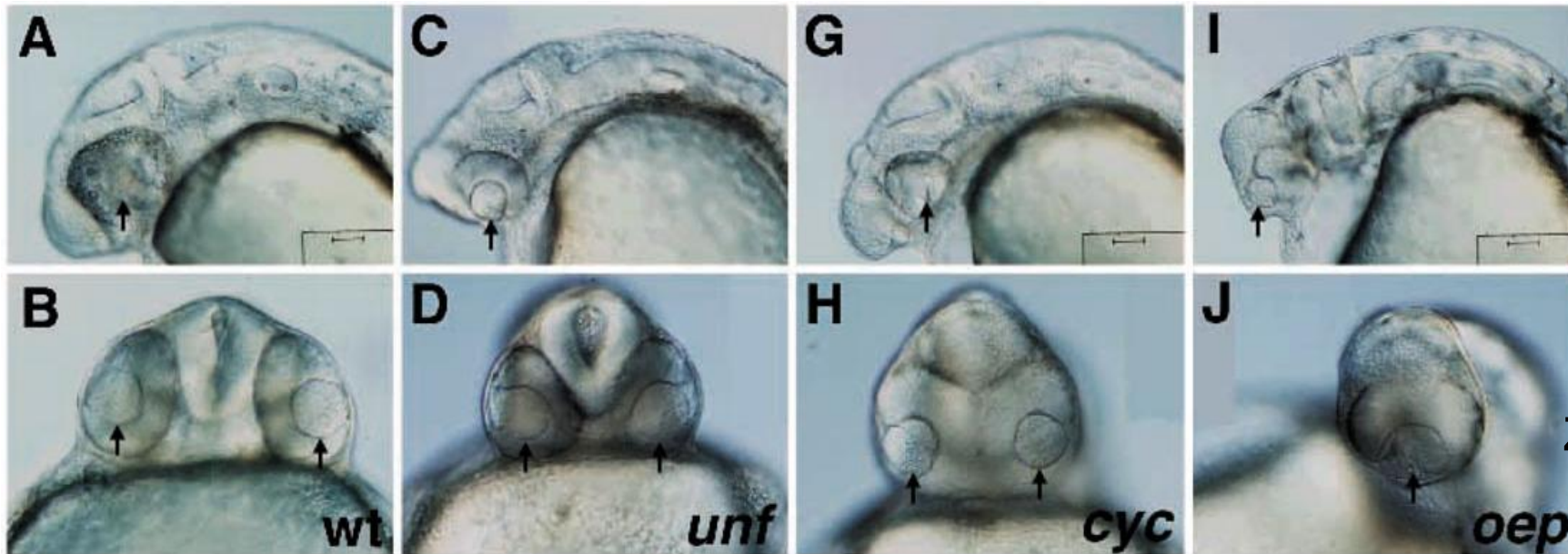
„Általános” embriókori defektusok vizsgálata



ember

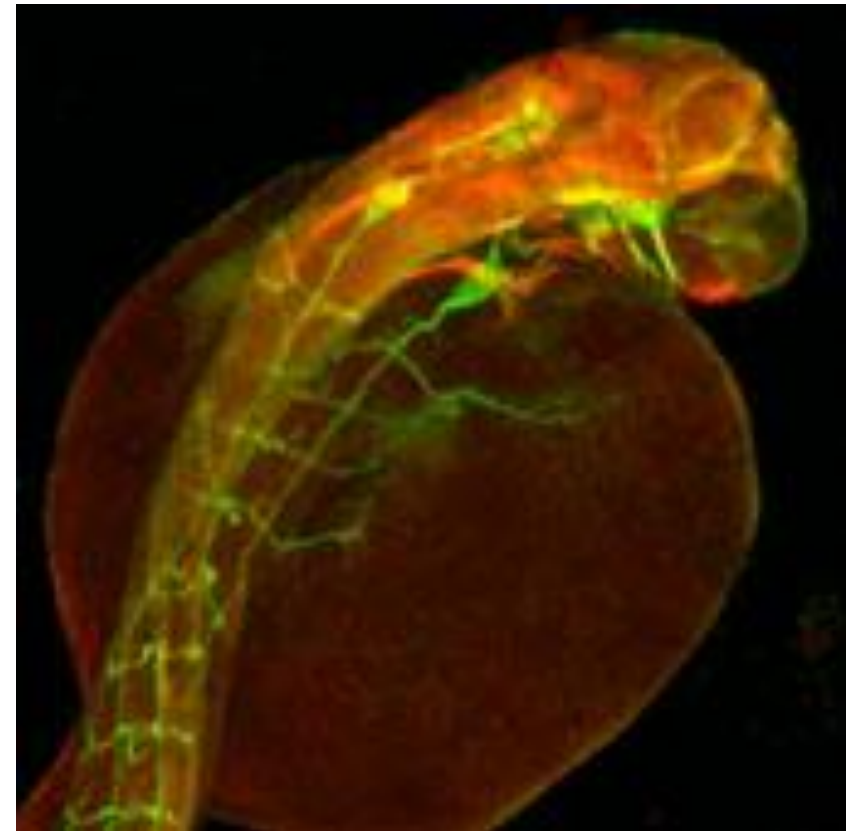
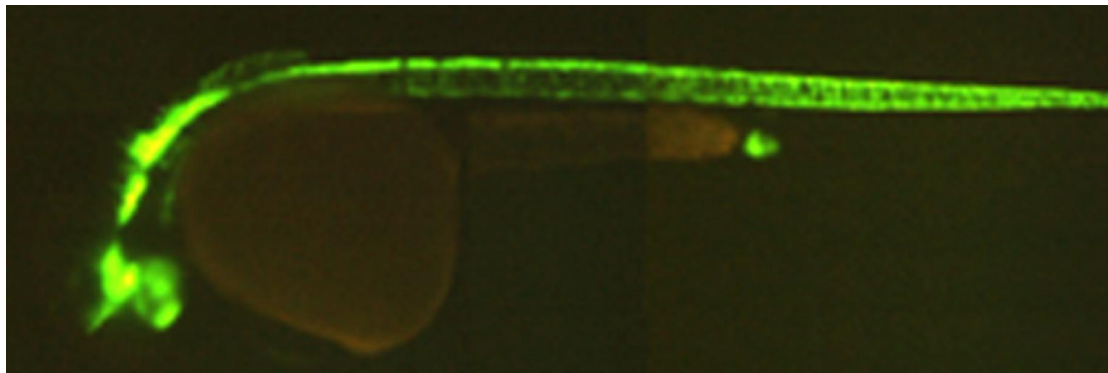
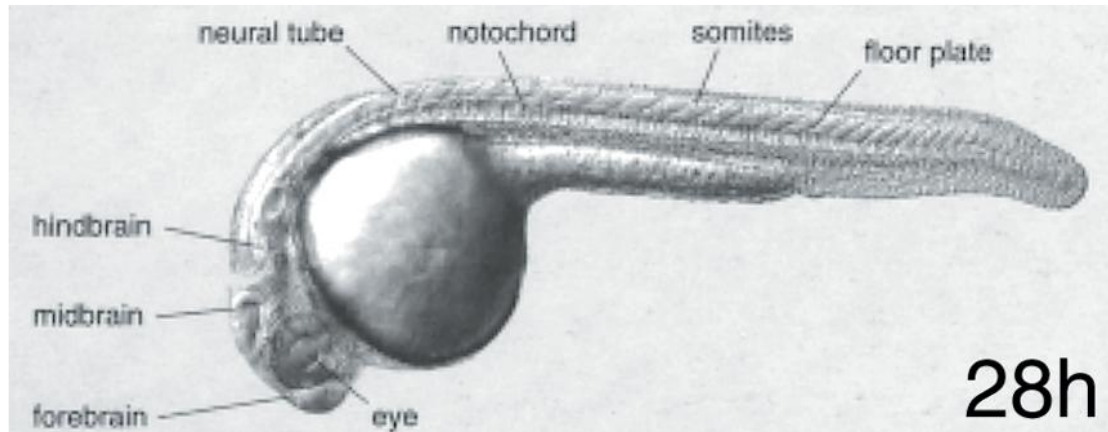


juh

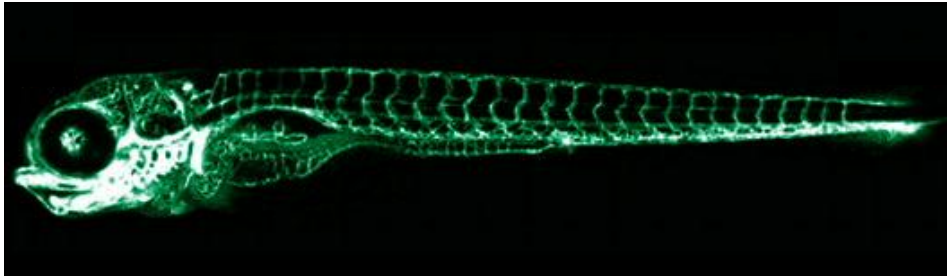


zebradánió

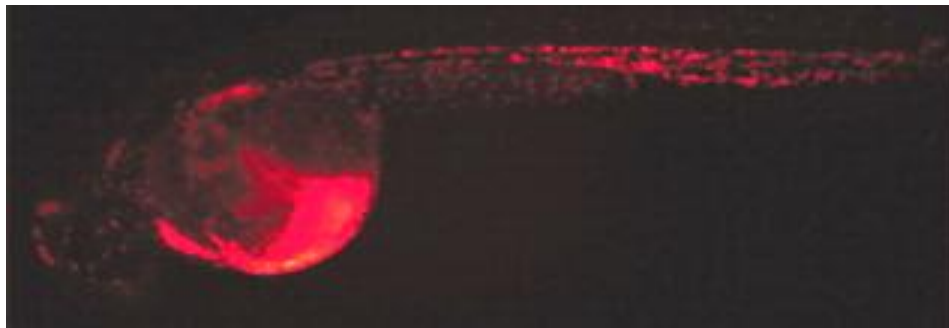
GFP (Green fluorescent protein) transzgenikus halembriókban



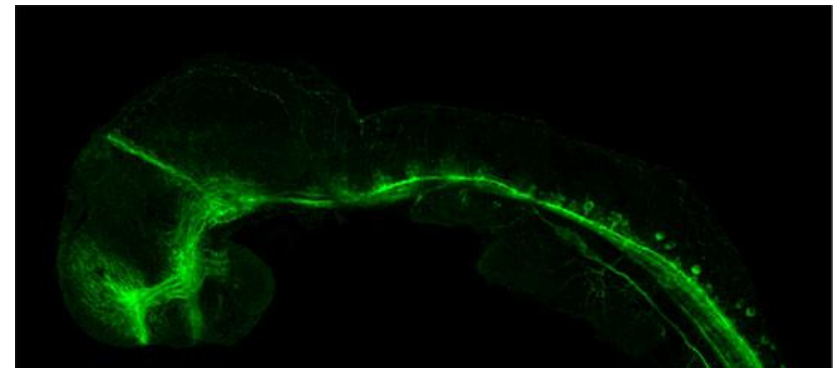
Toxikológiában is használatos transzgenikus zebrafánió vonalak



Fli-1 (Friend leukemia integration site-1)
(GFP: green)



GATA-1 (globin transcription factor-1)
(DsRed, red)

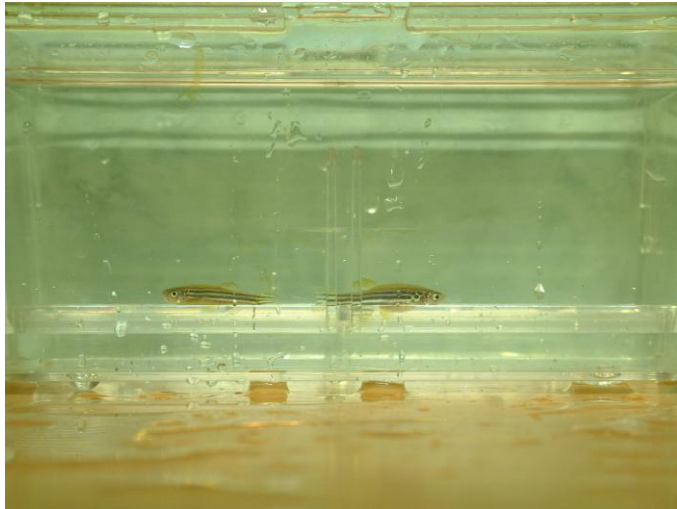


Neurogenin
(GFP=Green)

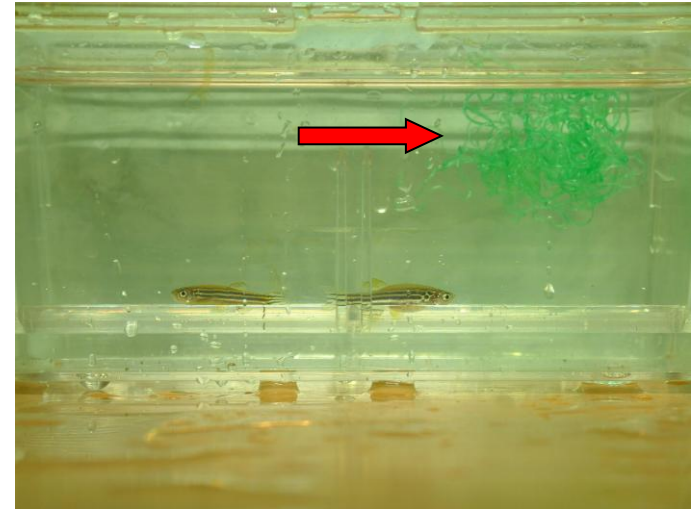
Zebradánió embriófejlődésében bekövetkező változások toxikus anyagok hatására

Effect of alcohol on zebrafish development.flv

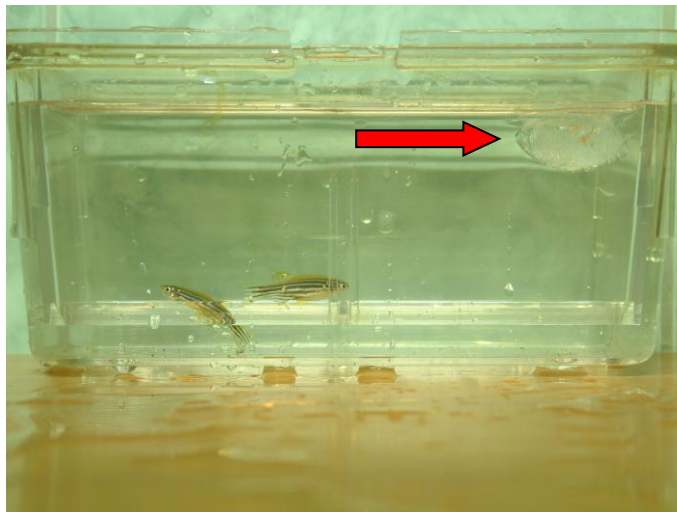
szaporítás



Szaporítóedényekben párban



műnövényel



Stimuláló hatások felerősítésével



csoportosan

Etetési terv

Weekly feeding plan

	Adult		Young			Baby*		
	morning	afternoon	morning	afternoon	evening	morning	afternoon	evening
Monday	SDS FOOD	SDS FOOD	ARTEMIA	SDS FOOD	SDS FOOD	SDS FOOD	SDS FOOD	SDS FOOD+ nematode
Tuesday	ARTEMIA	SDS FOOD	ARTEMIA	SDS FOOD	SDS FOOD	SDS FOOD	SDS FOOD	SDS FOOD+ nematode
Wednesday	SDS FOOD	SDS FOOD	ARTEMIA	SDS FOOD	SDS FOOD	SDS FOOD	SDS FOOD	SDS FOOD+ nematode
Thursday	SDS FOOD	SDS FOOD	ARTEMIA	SDS FOOD	SDS FOOD	SDS FOOD	SDS FOOD	SDS FOOD+ nematode
Friday	ARTEMIA	SDS FOOD	ARTEMIA	SDS FOOD	SDS FOOD	SDS FOOD	SDS FOOD	SDS FOOD+ nematode
Saturday	SDS FOOD	SDS FOOD	ARTEMIA	SDS FOOD		SDS FOOD	SDS FOOD+ nematode	
Sunday	SDS FOOD	SDS FOOD	ARTEMIA	SDS FOOD		SDS FOOD	SDS FOOD+ nematode	

* after the 10th day feed with artemia

Napi rutin regiszter

Dátum: 2008. 01. 16 Idő: 15³⁰
Név: ZSÓTY

Szoba hőmérséklet: 26°C
Víz hőmérséklet: 24,4°C
pH: 7,6
Vezetőképesség: 443 µS
Vízátfolyás: ✓

Reverzozm.készülék: nyomás/ vezetőképesség: 4,86. 11,2 µS

NH3: 0
NO2: 0
NO3: 10 ppm
PO4: 1 ppm

Etetés: de. du. este
Időpont: 9³⁰ 13⁴⁵ 15²⁰

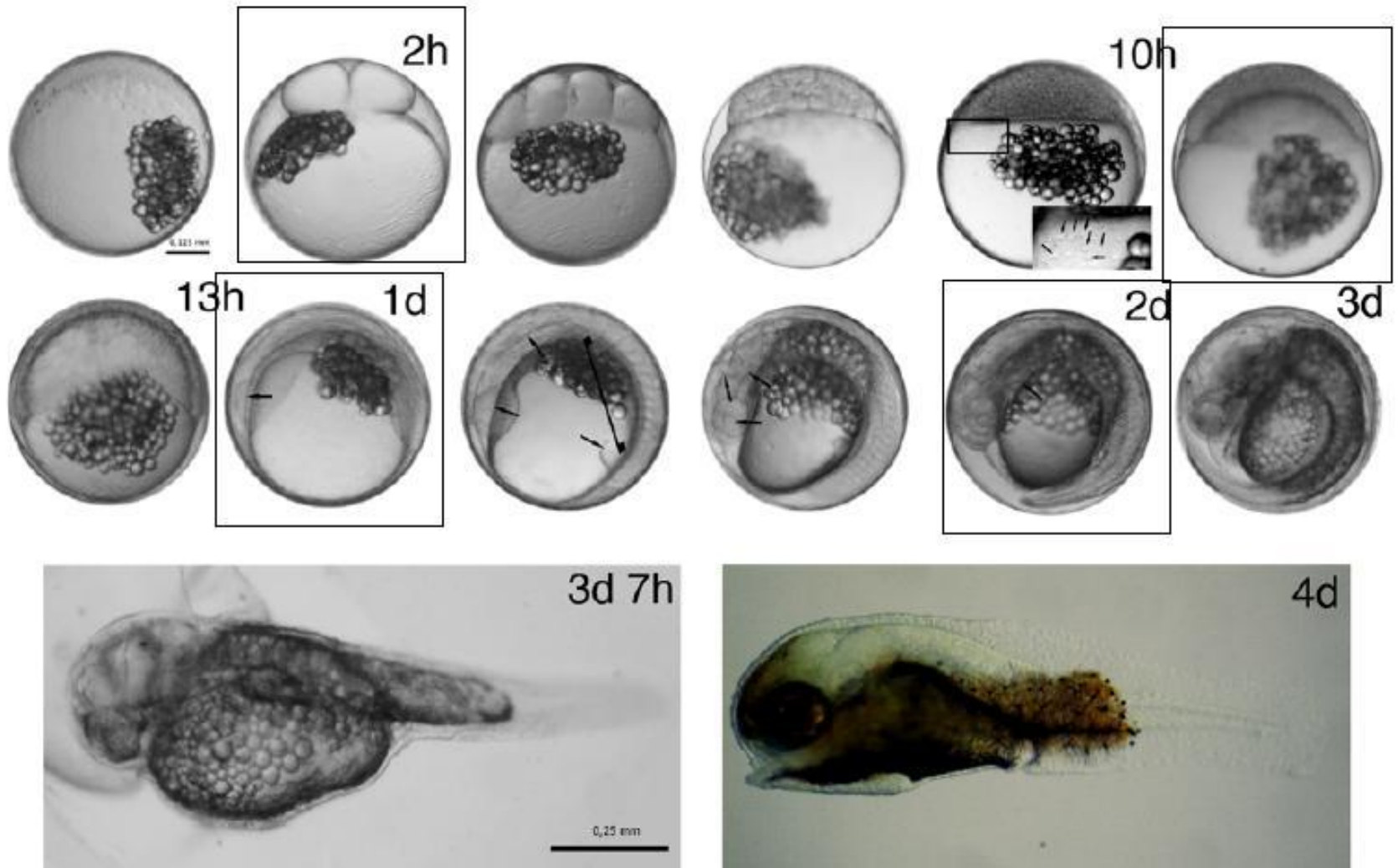
Etetés mikro: ✓
Artemia keltető feltöltése: ✓
Durva szűrő mosás: —
Szivacs szűrő mosás (szerda): —

Elhullás: medence mennyiség
—

Egyéb: —



Édesvízi gömbhalak
Tetraodon nigroviridis
Tetraodon travancoricus
Takifugu rubripes
(Tetraodontiformes)



Tetraodon travancoricus (dwarf pufferfish)



female



male



1 day



5 days



9 days



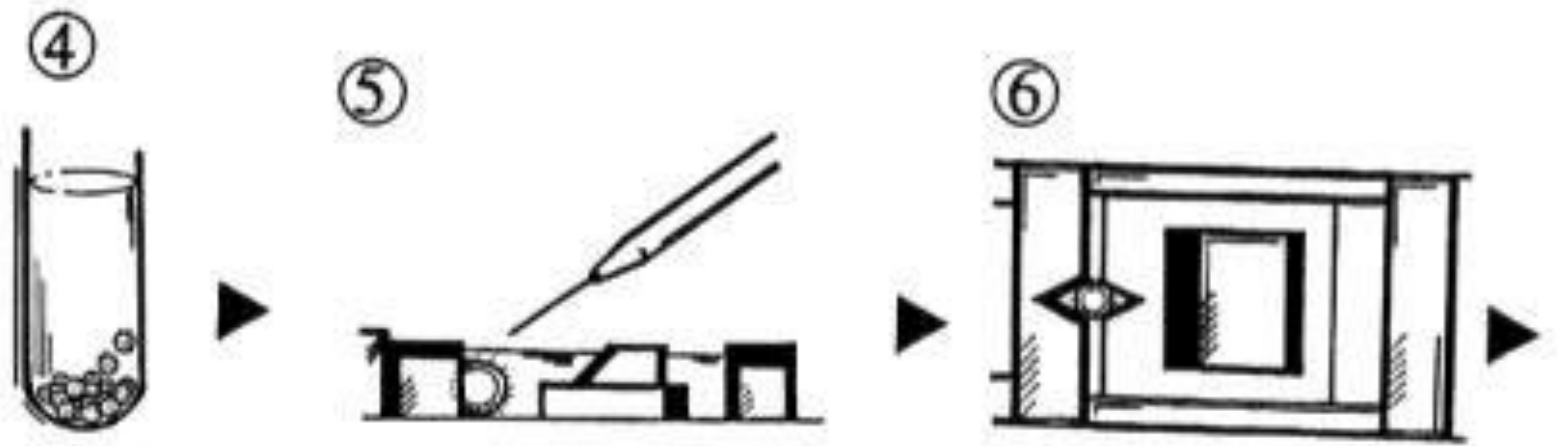
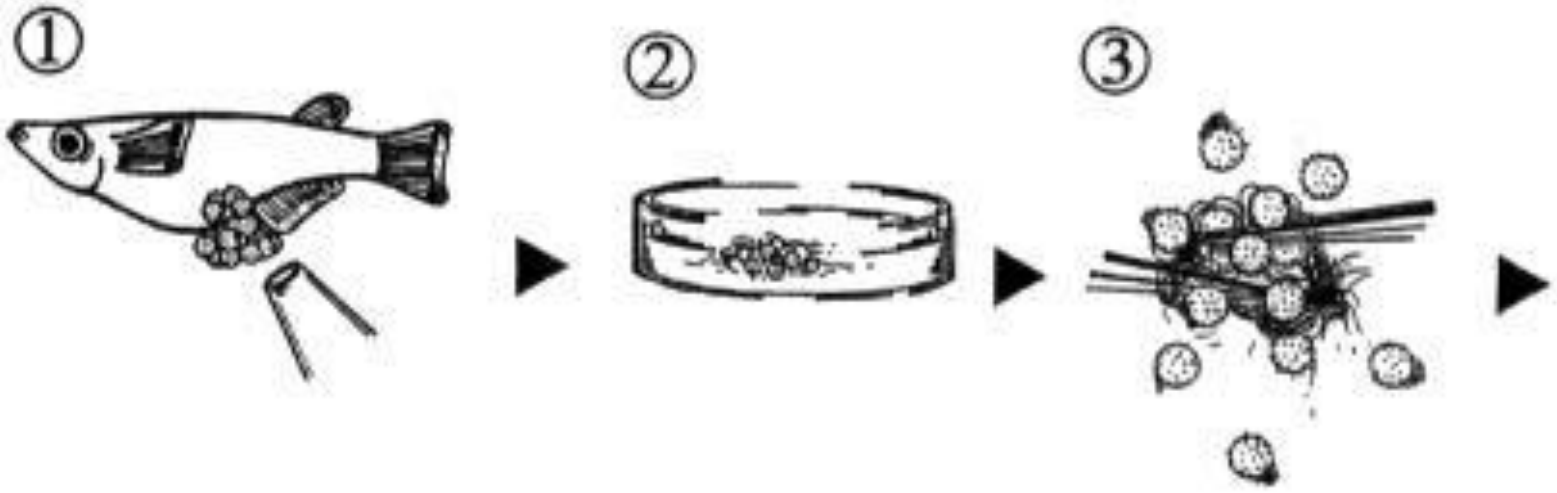
2 weeks



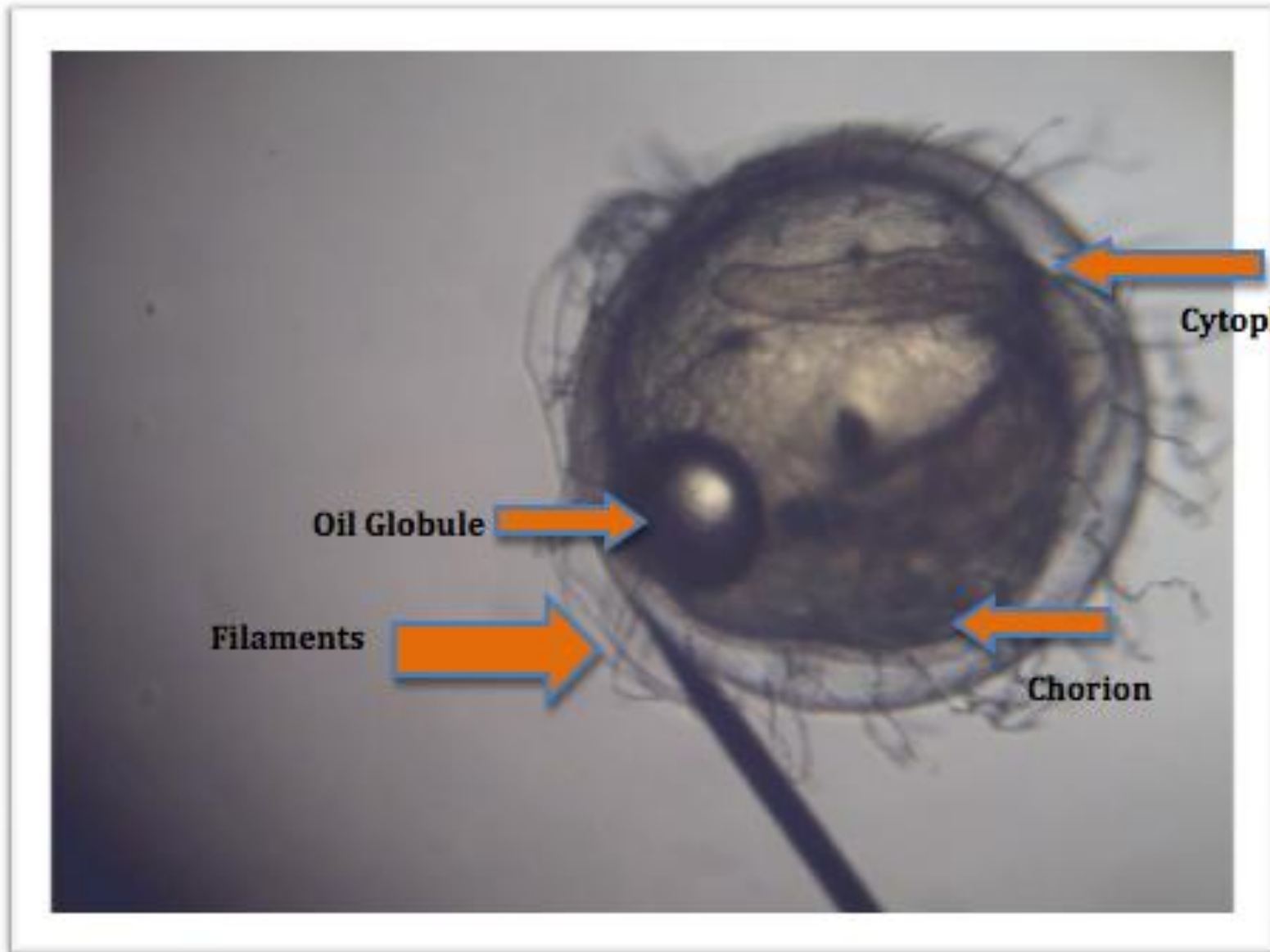
1 month

Medaka (*Oryzias latipes*)





MEDAKA EGG – DAY TWO



Szivárványos guppi (*Poecilia reticulata*)



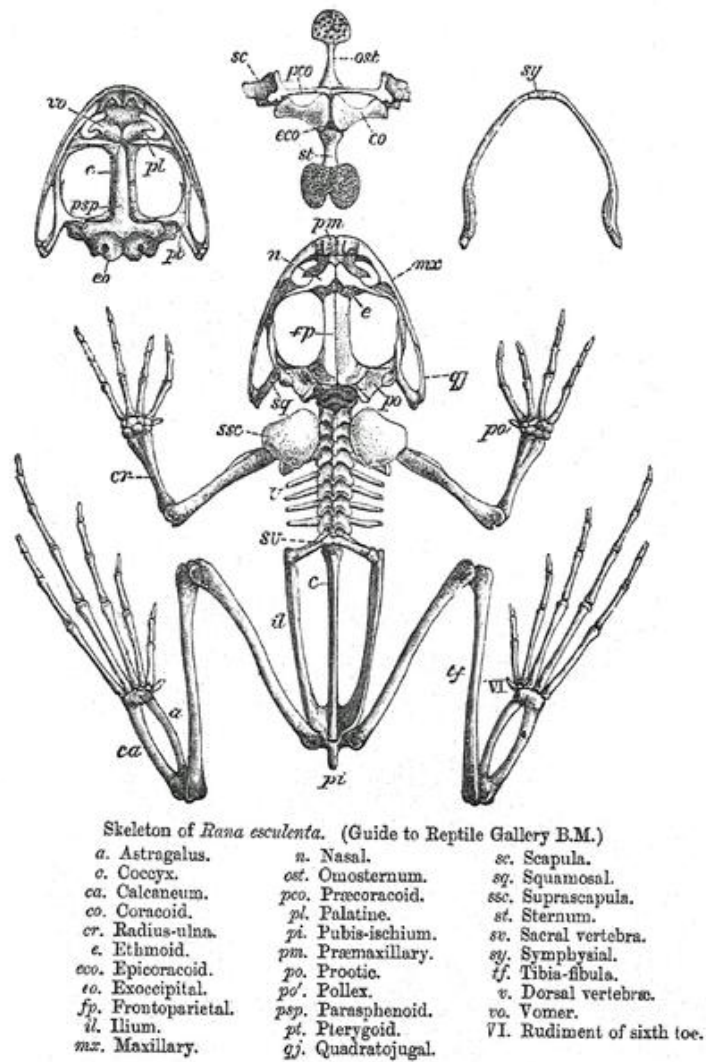
Szivárványos pisztráng (*Oncorhynchus mykiss*)



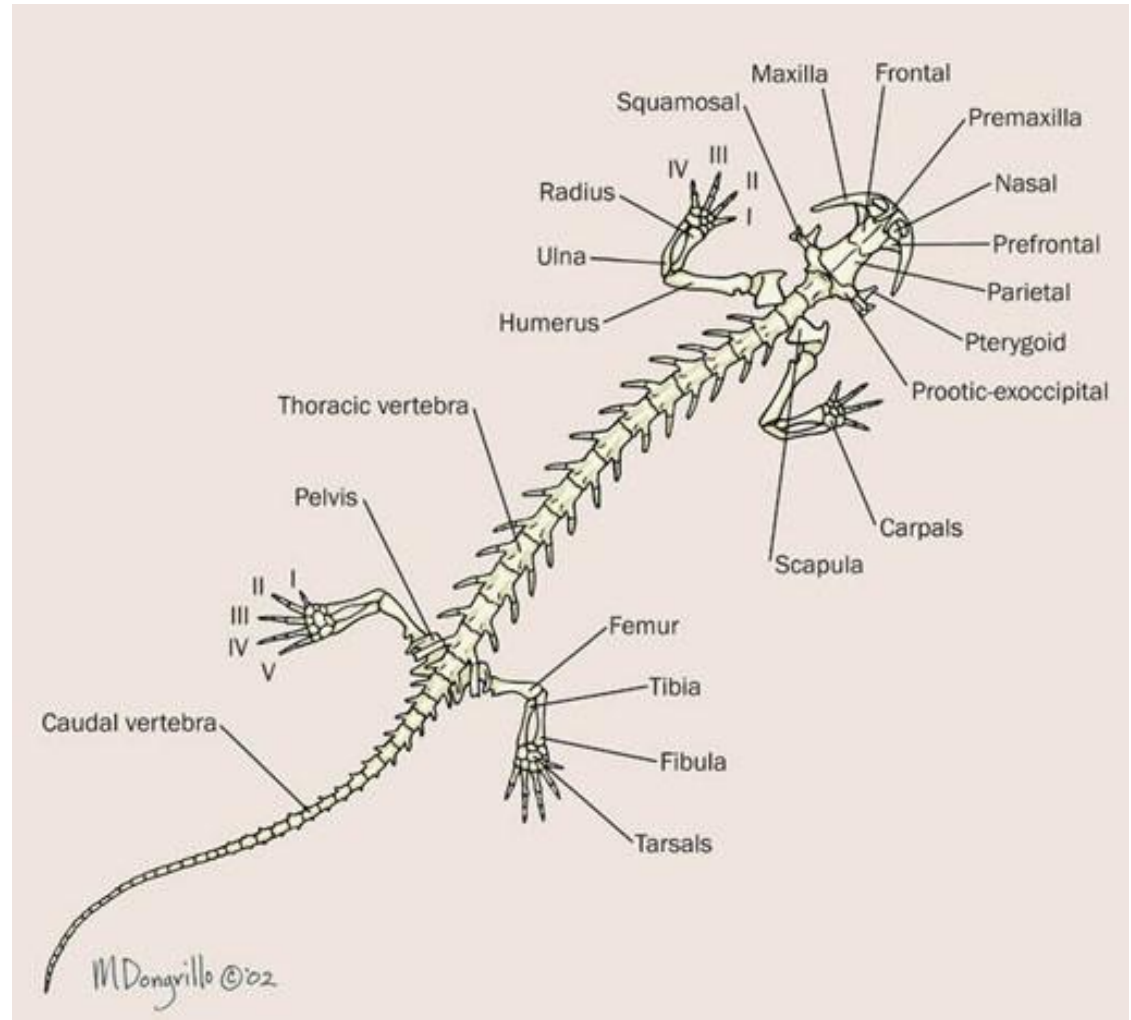
Ponty (Cyprinus carpio)



Kétéltűek

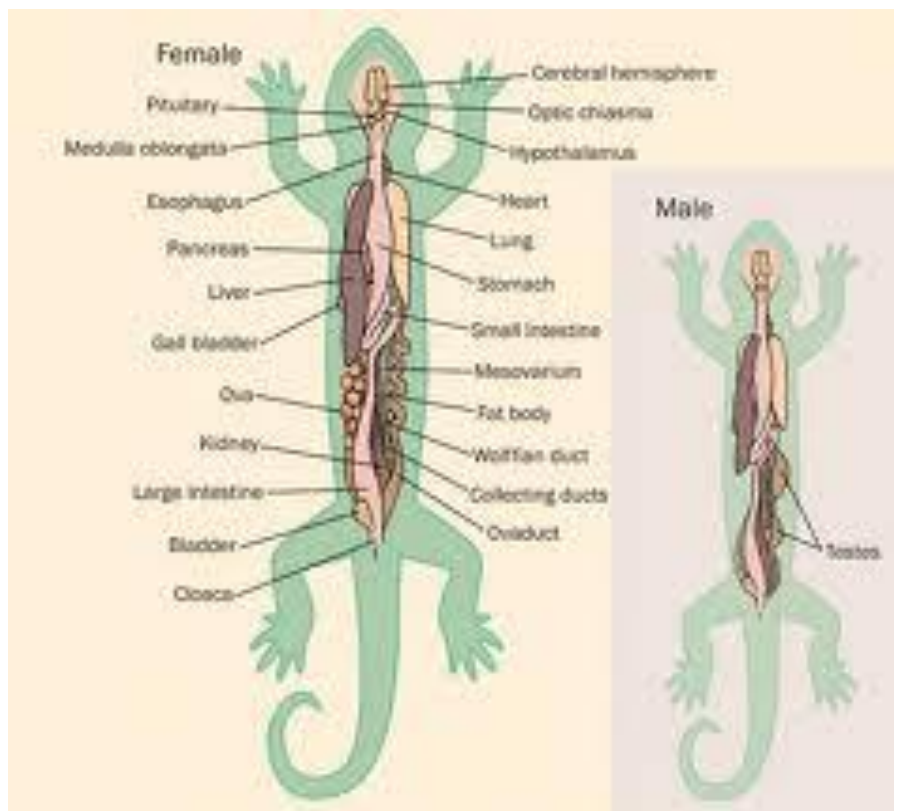
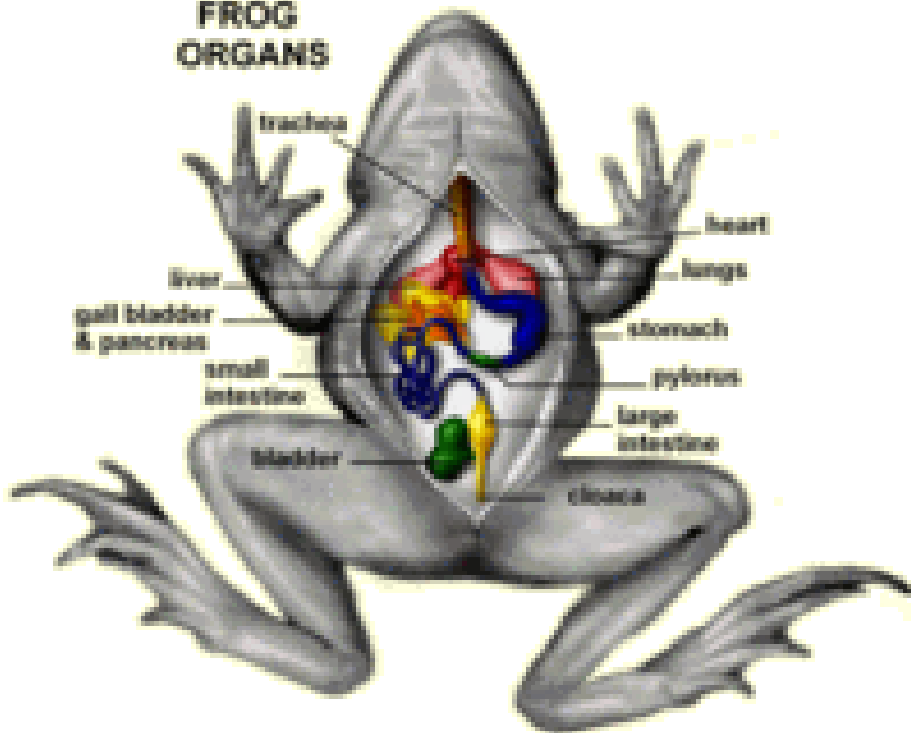


Farkatlan kétéltűek



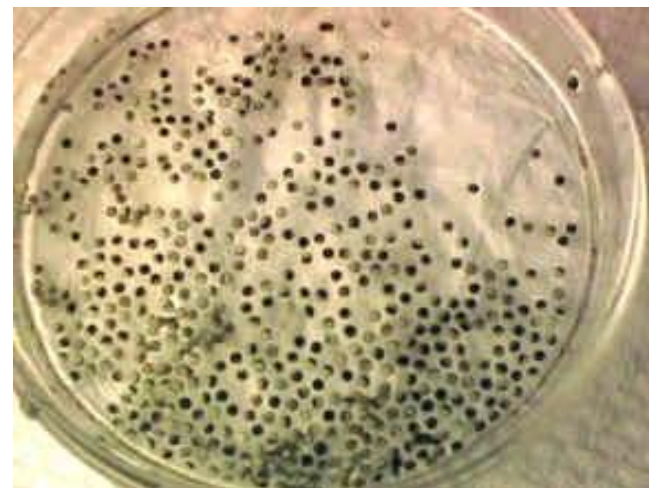
Farkos kétéltűek

FROG ORGANS



Karmosbékák (*Xenopus laevis*, *X. tropicalis*)

- Elnevezés: a hátsó lábakon a belső 3 lábujj belső oldalán visszahajló fekete karmok
- Könnyen tartható
- Hosszú élettartam (fogságban 3-20 év)
- nőstény: 9-14 cm, hím: 7-9 cm
- Szexálás: a nőstényeknél kissé kitüremkedő kloáka, a hímeknél a mellső lábak belső oldalán nászpárna
- Ragadozó (férgek, rovarok, kannibalizmus)
- Nyelv és farok nélküli
- teljes mértékben vízi életmódot folytat
- Évente 3x szaporítható (hormonindukció!)
- Mindkettőt használják modellállatként, de a *tropicalis* kedveltebb, mert diploid és korábban válik ivaréretté, utóbbi sötétebb
- Klórra rendkívül érzékeny, klórmentes vízben kell tartani!
- Ektoterm
- 19-25 °C víz, a hőmérsékletváltozásra nagyon érzékeny, 5 foknál nagyobb hirtelen változásra elpusztul
- 1-2 liter víz/egyed, legalább 30 cm vízmélység
- Legyen megfelelő búvóhely



- Általában az aljzathoz közel tartózkodnak, de fel kell jönniük a felszínre levegőt venni 12 órás fény/sötét ciklus
- Etetés: 2x-3x hetente
- Nagyon gyorsan elfogyasztják a táplálékot
- Ha egymás lábait kapják el és kezdik lenyelni, vagy túlzásfolt a medence vagy éhesek
- Csak púdermentes kesztyű vagy kesztyű nélkül! A bőr felszínén található védőréteg sérülhet, fertőzésveszély!
- A bőrfelületen sok érzékeny idegvégződés, ezért óvatosság!
- Szaporítás:
 - Hormonindukció: hím: 50U HCG, nőstény: 750 U HCG
 - Kihelyezés külön edénybe egy éjszakára, nyugalom
 - A szaporítóedény aljára rácsot kell tenni, hogy ne egyék meg a petéket
 - Vagy: mesterséges megtermékenyítés (IVF): a petesejtek száraz petricsészébe, majd a kiműtött heréből rányomni a spermát, majd 0,1x MMR oldat (+gentamycin)
 - Ha az animális pólus felfelé néz, a petesejtek megtermékenyültek



Nevelés: 20-22 fokon

Gasztruláció 1 napon belül, második-harmadik napon kelnek ki

Etetés elkezdése: amikor az ebihalak elúsznak és 45 fokos szöget zárnak be az aljzattal, fejjel lefelé, csalánporral vagy porított zöldborsóval kell eteni naponta

Max 6-8 lárva/liter

Vízcsere 3 naponta

5-6 hét után metamorfózis, 15-20 napot vesz igénybe

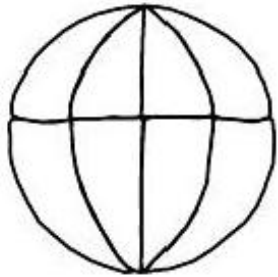
Amikor a mellső lábak megjelennek, abbahagyja a táplálkozást (akkortól, amikor a táplálékot már nem fogyasztja el 5-6 órán belül, ahogy normálisan)

Miután a farok kb. fele eltűnik, szúnyoglárvával, húspéppel, marhaszívvvel kell etetni

Kifejlett: 2liter víz/egyed

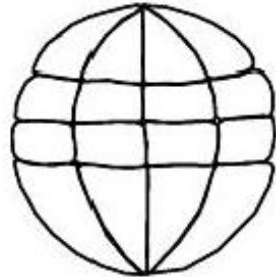


Early developmental stages of *Xenopus laevis*



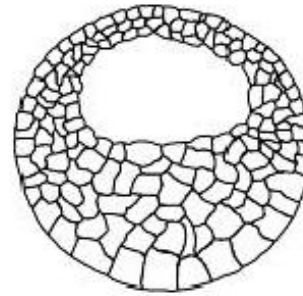
ventral-----dorsal
animal up, vegetal down

2.5 hpf



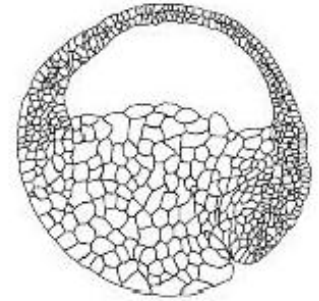
32-cell/ stage 6

3.5 hpf



stage 8

5 hpf

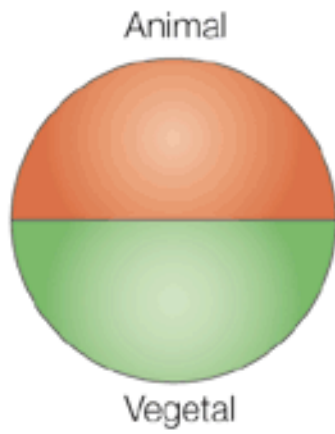


stage 10.5

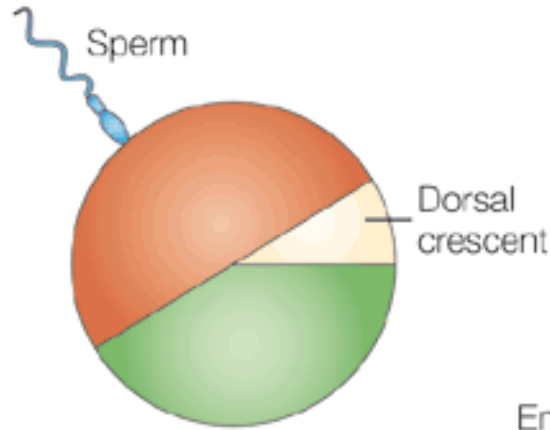
10 hpf

hpf: hours post-fertilization

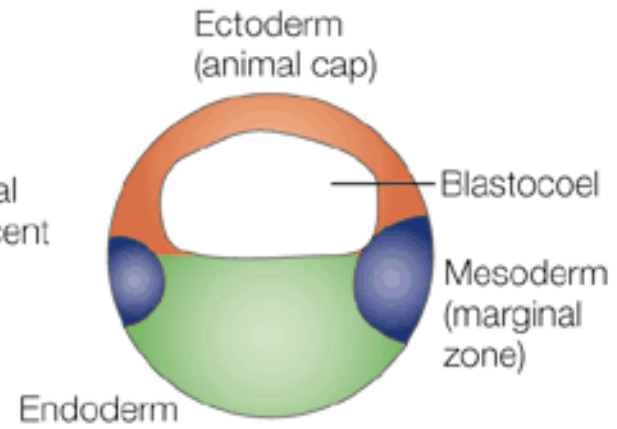
Oocyte



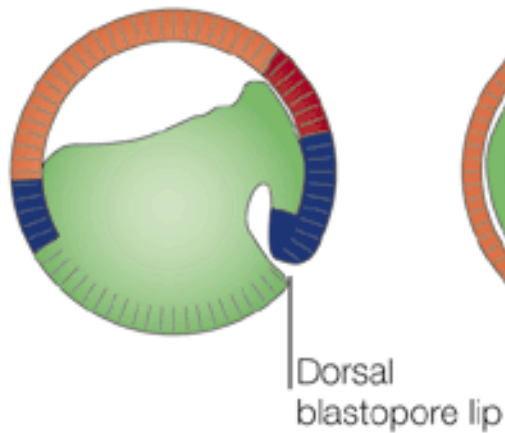
Fertilized egg



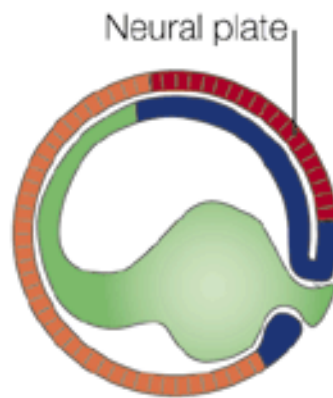
Blastula



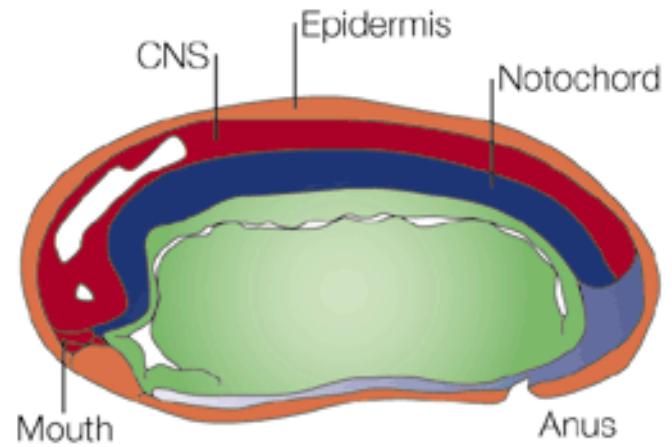
Gastrula

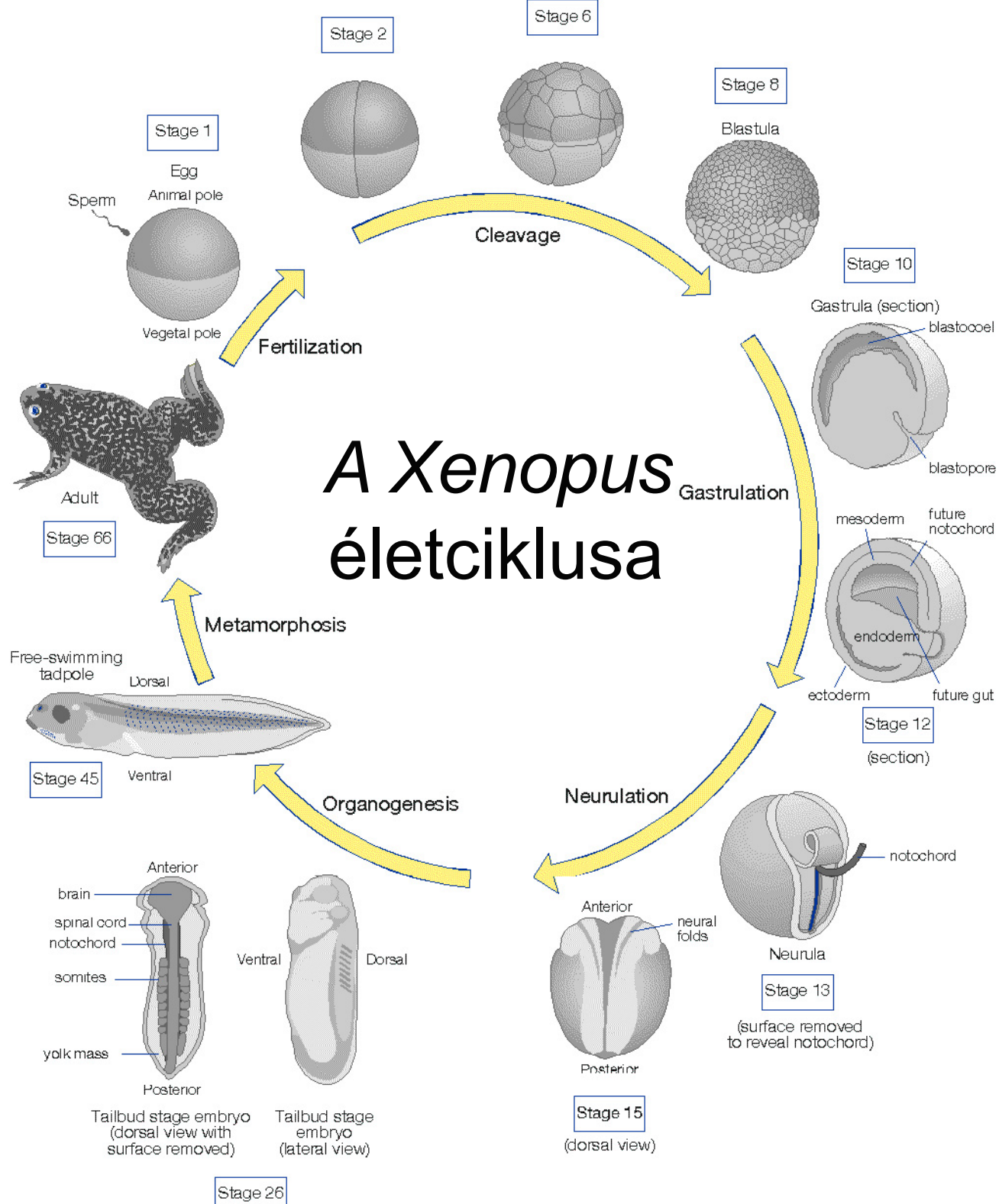


Neurula



Tailbud





Mexikói axolotl (*Ambystoma mexicanum*)



- Eredeti vadszínű és az albínó változat fordul elő.
- Az állatok hossza elérheti a 28-30 cm-t. Törzsük megnyúlt, farkuk oldalról lapított, végtagjaik rövidek. Első pár lábain négy, a hátsókon öt ujj van. Bőrük mirigyekben gazdag, és fényérzékeny. 25 évig is élhetnek.
- Az axolotlok a vízi életmódhoz alkalmazkodtak, tartásuk egyszerű, (100 x 50 x 25) medencében 4-6 axolotl.
- pH 6,5-től pH 8,5-ig, víz hőmérséklet 14-18 °C
- Az Axolotlokkal finoman, óvatosan kell bánni.
- Heti 2-3 alkalommal etethetők.
- Az axolotl az egyik olyan állatfaj, amely lárva állapotban képes a szaporodni.
- Nem elég a nőtényt és a hímeket összeengedni. Elengedhetetlen azokat a körülményeket biztosítani, amik az íváshoz szükségesek. Ez általában a hőmérséklet változtatása.
- A peték száma 300-600 között van

Axolotl Development

8-Cell



Blastula



Gastrula/Yolk Plug



Neurula



Early Tailbud

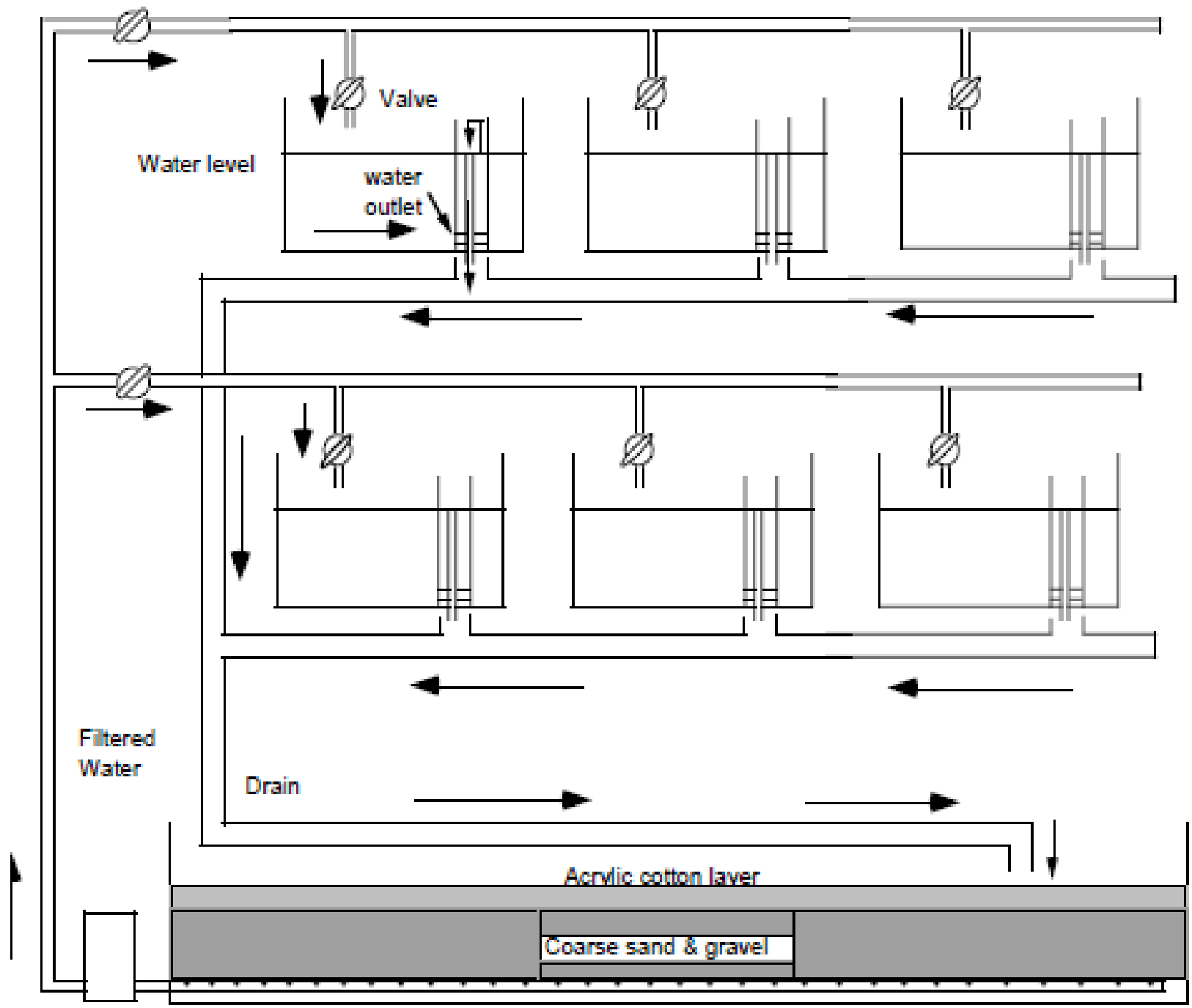


Tailbud



Tadpole





Klasszikus tesztek I

A zebradánió, mint modellállat

- A zebradánió napjainkban az egyik legkedveltebb modellállata számos tudományterületnek.
- Laboratóriumi körülmények között is könnyen tarthatóak, kis testűek, a víz, illetve a táplálék minőségére kevésbé érzékenyek, helyigényük kicsi.
- Egyedfejlődésük igen gyors, 3-4 hónap az ivaréérésig.
- Embriógenézisük *ex utero* nyomomonkövethető.
- Jelenleg 7996 (2009) leírt mutáns vagy transzgenikus vonal létezik (www.zfin.org).
- A halak az egyetlen kizárólag vízben élő gerinces szervezetek.
- A zebradánió a faj adottságai miatt kiválóan alkalmas az ökotoxikológiai vizsgálatok modell szervezetének.

Alapfogalmak

Approximatív letális koncentráció (ALC): az a legkisebb koncentrációérték, amelynél meghatározott időn belül a kísérleti élőlények még pusztulnak, illetve károsodnak.

Ártalmatlan koncentráció (*hatástalan szint*): az a legnagyobb töménység, amely az adott kísérleti körülmények között, illetve idő alatt még, vagy már semmi károsodást nem okoz a kísérleti élőlényekben.

Ártalmatlan szint (*maximális biztonsági szint*): valamely hatásnak (sugárzás, hő, vízmozgás, anyag, mérreg, szennyvíz stb.) az a legnagyobb mennyisége, amely a tesztélőlényt biztosan nem károsítja.

Biztonsági koncentráció: a mérgezőanyagnak az a töménysége, amely a tesztélőlényeket még éppen nem károsítja.

CL₅₀, LC₅₀: *közepes halálos töménység.*

Concentratio letalis: *halálos töménység.*

Dil.TL_m: *közepes tűrés határa.*

Dil.TL₀: az a legnagyobb hígítási érték, amelynél a kísérleti időn belül a kísérleti élőlények, illetve életfolyamataik már nem károsodnak.

Dil.TL₁₀₀: az a legkisebb hígítási érték, amelynél a kísérleti időn belül az összes kísérleti élőlény elpusztul, illetve életjelenségeik leállnak.

Halálos adag (*letális dózis, dosis letalis, LD vagy DL*) valamely mérreg vagy hatóanyag olyan testsúlyra számított mennyisége, amely a szervezetbe kerülve pusztulás okoz.

Halálos idő (*letális idő, tempus letalis, LT*): valamennyi testlőlény pusztulási ideje egy mérreg adott koncentrációjában.

Halálos töménység (*letális koncentráció, concentratio letalis, LC₁₀₀ vagy CL₁₀₀*): a mérreg vagy a hatóanyag olyan töménysége az életközegben (levegő, víz), amely éppen elég a testlőlények elpusztulására.

Hígítási igény: az a mérregmentes vízmennyiség, amennyit a mérgezőanyagot tartalmazó oldathoz adva az ártalmatlan koncentráció eléréséhez szükséges.

Közepes halálos adag (*dosis letalis 50%*, LD_{50} vagy DL_{50}): az az adag, amelytől az élőlények fele meghatározott idő alatt elpusztul vagy az életjelensége 50%-kal csökken.

Közepes halálos idő (LT_{50}): a tesztélőlények felének pusztulási ideje egy mérreg adott koncentrációjában.

Közepes halálos töménység (*concentratio letalis 50%*, LC_{50} vagy CL_{50}): valamely mérreg vagy hatóanyag olyan töménysége az életközegben (levegő, víz), amelytől a tesztélőlények fele pusztul el vagy aktivitásuk 50%-kal csökken.

Közepes hatékony töménység (EC_{50}): víztoxikológiai teszt során az a hatóanyag-töménység, amelytől a kísérleti élőlények fele károsodott.

Közepes tűrés határa (*tolerantiae limes medialis, median tolerance limit, TL_m*): valamely mérreg vagy más hatás (hőmérséklet, sugárzás, vízmozgás stb.) olyan mennyisége, amely a kísérleti időn belül a tesztélőlények felét elpusztítja vagy a mért életjelenségnek (légzés, fotoszintézis, enzimaktivitás stb.) erősségét a felére csökkenti.

Kritikus koncentráció: az a töménység, amelynél az élőlények károsodásának első jelei jelentkeznek. Ezek pl. a légzés vagy a fotoszintézis csökkenésének kezdete, a halak „pipálnak” vagy egyensúlyi zavaraik keletkeznek.

Vízminőség. Az édesvízi halakra veszélyes anyagok akut halálos mérgező hatásának meghatározása [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)] felhasználásával. 1. rész: Statikus módszer (ISO 7346-1:1996)

- Az ISO 7346 szabványsorozat három része módszereket ír le az anyagok akut halálos toxicitásának meghatározására zebradánión (+ más fajokon is)
- Az ISO 7346 szabványsorozat három részén belül választani lehet a **statikus**, a **félstatikus** és az **átfolyásos módszer** között.

A módszer elve

- Megadott feltételek között meghatározzuk azokat a koncentrációkat, amelyek természetes vízben 24, 48, 72, illetve 96 órás expozíciós idő alatt, a *zebradánió* vizsgált populációjának 50%-ára halálos mennyiségű anyagot tartalmaznak. Ezeket a félfletális koncentrációkat 24 h – LC50-nek, 48 h – LC50-nek, 72 h – LC50-nek és 96 h – LC50-nek nevezzük.

A teszt két lépésből áll:

- (a) elővizsgálatból, amely megadja az akut félfletális koncentrációk megközelítő értékét, és kijelöli a végső toxicitási tesztben alkalmazandó koncentrációtartományt;
- (b) végleges vizsgálatból, amelynek az eredményét közöljük.

A tesztszervezettel szemben támasztott követelmények

- Minden teszthal teljes testhossza legyen $30 \text{ mm} \pm 5 \text{ mm}$, ami elméletileg $0,3 \text{ g} \pm 0,1 \text{ g}$ testtömegnek felel meg. A kiválasztott teszthalak származzanak azonos állományból.
- Az állományt akklimatizálni kell, azaz, a teszt kezdete előtt minden esetben legalább 7 napig.
- A halakat a szokásos módon kell etetni, egészen a vizsgálatot közvetlenül megelőző 24 órás periódusig.
- A halaknak mentesnek kell lenniük minden nyilvánvaló betegségtől, illetve látható torzulástól. Nem szabad kezelést kapniuk betegség ellen sem a teszt időtartama, sem az azt megelőző 2 hét alatt.

Standard hígítóvíz

- A frissen elkészített standard hígítóvíz pH-ja $7,8 \pm 0,2$, Kalciumkeménysége 250 mg/l (Kalcium-karbonát-ban kifejezve) legyen, és a következő koncentrációban tartalmazzon desztillált vagy ionmentesített vízben oldott sókat:
 - 294,0 mg/l $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
 - 123,3 mg/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
 - 63,0 mg/l NaHCO_3
 - 5,5 mg/l KCl
- A hígítóvizet addig kell levegőztetni, amíg az oldott oxigén koncentráció eléri legalább a légtelítettség (ASV) 90%-át és a pH-ja $7,8 \pm 0,2$ szinten állandósul. Szükség esetén állítsuk be az oldat pH-ját nátrium-hidroxidoldat vagy sósav hozzáadásával. Az ily módon elkészített hígítóvizet ne levegőztessük tovább a felhasználásig.

- **A vizsgálandó anyagok törzsoldatainak elkészítése**
- A vizsgálandó anyag törzsoldatának elkészítése esetén a vizsgálandó anyag ismert mennyiségét oldjuk hígítóvíz, ionmentesített víz vagy desztillált víz meghatározott térfogatában.
- A kis vízoldékonyságú anyagokat diszpergálni lehet megfelelő módszerrel, beleértve az ultrahangos diszperziót, vagy a halra nézve kis toxicitású szerves oldószerek alkalmazása is lehetséges.
- Ha bármilyen oldószert alkalmazunk, annak koncentrációja a tesztoldatban ne haladja meg a 0,1 ml/l, vagy a 0,1 g/l végkoncentrációt, attól függően, hogy melyik ad nagyobb értéket (+ oldószeres kontroll kell).

Berendezések

- Minden anyag és eszköz, ha érintkezhet olyan folyadékkal, amelybe halakat helyezünk, vagy közvetlenül érintkezésbe kerülhet a halakkal, legyen kémiaailag semleges, és ne kösse meg jelentős mértékben a vizsgálandó vegyületet.
- **Tesztedények**, elégséges térfogatúak legyenek, max. 1g/hal/l
- **Hőmérséklet-szabályozó**, a tesztoldatok és a tárolótartályban lévő víz hőmérsékletének $23\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ -on való tartására, egy erre alkalmas módszerrel.
- **Merítőháló**, nylonból vagy más kémiaailag semleges anyagból, egy a kontroledényhez és egy másik a többi tesztedényhez (hígtól a töményebb felé dolgozunk)

- **Vizsgálati környezet**
- Az oldatok készítését és tárolását, a halak tartását, továbbá minden tevékenységet és vizsgálatot olyan légtérű területen kell végrehajtani, amelyben nincsenek jelen káros koncentrációjú légszennyező anyagok.
- El kell kerülni minden olyan zavaró hatást, amely megváltoztathatja a halak viselkedését. Minden vizsgálatot normál laboratóriumi megvilágítással, 12–16 órás nappali fényperiódussal végezzük.

- **Eljárás**

Limittesztet végezhetünk a vizsgálandó vegyülettel annak a vizsgálati feltételek közötti vízoldhatósági határértékén, vagy 100 mg/literrel – amelyik érték kisebb – annak kimutatására, hogy a 96 h-LC50 értéke nem nagyobb-e ennél a koncentrációnál. Ha egyetlen hal sem pusztul el a limittesztben, nincs további vizsgálatra szükség.

- A limittesztet 10 hallal kell végezni, ugyanilyen számú kontrollal (kontrolokkal) szemben.

- **Elővizsgálat**
- Öt tesztedénybe mértani sorozatos hígítás, például 1000 mg/l-t, 100 mg/l-t, 10 mg/l-t, 1 mg/l-t és 0,1 mg/l-t. A hatodik tesztedénybe amely kontrolként szolgál csak hígítóvizet.
- Helyezzünk minden edénybe három halat.
- Naponta legalább kétszer jegyezzük fel az edényekben elpusztult halak számát, és az oldott oxigén koncentrációját.
- Az elpusztult halakat távolítsuk el.
- Ha az adatok nem elegendőek a végső vizsgálatához használendő koncentrációtartomány megállapításához, ismételjük meg ezt az előzetes vizsgálatot más koncentrációtartományokban.

- **Végleges vizsgálat**
- Válasszunk legalább öt koncentrációt, amelyek megközelítőleg mértani sort alkotnak. Egyes esetekben szűkebb koncentrációtartományt kell használni ahhoz, hogy a kívánt adatokat megkapjuk, más esetekben éppen egy szélesebb tartomány szükséges.
- A halakat az állományból véletlenszerűen válasszuk ki, és véletlenszerűen helyezzük azokat a teszedényekbe. Az adott vizsgálatban az összes hal áttételének 30 percen belül kell megtörténnie.
- Az elpusztult halakat a lehető leggyorsabban távolítsuk el az edényekből. A megfigyeléseket gyakrabban is végezhetjük, például ha meg akarjuk határozni a közepes túlélési időt az egyes koncentrációkra.

- Jegyezzük fel a halak bármilyen rendellenes viselkedését.
- Ha az anyag kimutathatóan stabil az expozíció tartama alatt, lehetőség szerint mérni kell a vizsgált anyag koncentrációját az edényekben legalább a vizsgálat elején és végén.
- Minden edényben legalább naponta, továbbá a teszt kezdetén és befejezésekor mérni kell az oldott oxigén koncentrációját, a pH-ját és a hőmérsékletét. A tesztoldatok hőmérséklete és pH-ja ne változzon ± 1 °C-nál, illetve 0,2 pH egységnél többet.
- jegyzőkönyvezés

Érvényesség

- Az eredmények akkor tekinthetők érvényesnek, ha a következő feltételek teljesültek:
- a) a vizsgálat folyamán a tesztoldatokban mért oldott oxigén koncentrációja legalább 60% ASV volt;
- b) ha a vizsgált vegyület koncentrációi a teszt időtartama alatt bizonyítottan vagy gyaníthatóan nem csökkentek jelentősen
- c) a kontrollhalak mortalitása nem haladta meg a 10%-ot, vagy a tartályonkénti egyet;
- d) a rendellenes viselkedést mutató kontrollhalak aránya nem haladta meg a 10%-ot vagy a tartályonkénti egyet;
- e) ha rendelkezésre áll a referenciavegyület [például kálium-dikromát ($K_2Cr_2O_7$)] 24 h-LC50 értéke az adott időszakban tartott halakra, és az elvárható mértékben egyezik a korábban ugyanabban a laboratóriumban kapott eredményekkel.

- **Vizsgálati jegyzőkönyv**

- A vizsgálati jegyzőkönyvnek a következő információkat kell tartalmaznia:
 - a) a szabványra való hivatkozást;
 - b) a tesztanyag kémiai azonosítását, és minden, az anyagra vonatkozó további adatot (például vízdoldékonyságot, illékonyságot, oktanol/víz megoszlási hányadost, lebomlási sebességet);
 - c) a hígítóvíz, a törzsoldatok és tesztoldatok elkészítésének módszereit;
 - d) a vizsgálatra vonatkozó minden olyan biológiai, kémiai és fizikai adatot, amely egyébként nincs a szabványsorozatban meghatározva, beleértve a vizsgált halak akklimatizációjának körülményeit, továbbá a halak testtömegét g/literben megadva;
 - e) a vizsgálat érvényességének meghatározásához figyelembevett adatokat:
 - 1) az oldott oxigén koncentrációt;
 - 2) a kontrollhalak között észlelt mortalitást;
 - 3) a rendellenes viselkedést mutató kontrollhalak arányát;
 - 4) a referenciavegyület LC50 értékét.

- f) a vizsgált névleges koncentrációk táblázatos felsorolását (a kémiai analízis eredményeivel, ahol ilyen rendelkezésre áll), továbbá a kumulatív százalékos mortalitást a vizsgálat kezdetét követő 24; 48; 72 és 96 órás periódusokban;
- g) a vizsgált anyag LC50 értékeit, lehetőség szerint 24; 48; 72 és 96 óránál, utalni kell a számítás módszerére és a kémiai analízis módszerére, ha volt ilyen;
- h) a koncentráció-hatás görbe meredekségét (és annak 95%-os konfidenciahatárait, ahol rendelkezésre áll);
- i) a koncentráció-hatás összefüggésének grafikus ábrázolását;
- j) a halak által produkált bárminemű szokatlan reakciót a vizsgálati feltételek között, és a vizsgált anyag által okozott bármilyen látható külsődleges hatást;
- k) a vizsgálati folyamatoktól való bárminemű eltérést, annak indoklásával.

megjegyzések

- Vízminták tesztelésekor, a minta vétel után 24 órával meg kell kezdeni a tesztet, probléma lehet a minta hőmérséklete.
- A zebradánió esetén a protokollokban meghatározott ASV 50% körüli érték sem okoz problémát a halaknak.
- Higítóvízként a halak tartására használt „rendszervizet” használjuk.
- A fél-statikus tesztek során munkaszervezési problémát vethet fel az akváriumok 24 vagy 48 óránkénti oldatcseréje.

Embriótesztek

- A tesztek során az OECD 212 irányelvet és a OECD 2006 Draft Proposal for a new guideline: Fish Embryo Toxicity Test (FET-Test) ajánlásait alkalmazzuk.
- A tesztekhez 24-es szövettenyésztő plate-ket használunk, minden lyukba 1 embriót helyezünk 2 ml tesztoldatba.
- Az embriókat a megtermékenyítés utáni 1 órában az oldatba kell helyezni.
- Koncentrációnként 20 fejlődésnek indult embriót kell alkalmazni.
- Az elhullás mellett az embriógenezis egyes meghatározott időpontjában lehet vizsgálni, az embriók a kontrollhoz képest való fejlődését.

Ilyen pont:

- 12 hpf (hour post fertilisation) a szomiták kialakulása és alakja
- 24 hpf a farok leválása a szikról
- 36 hpf a szív működés ellenőrzése.

Tapasztalatok:

- Az embriók 1 órával a megtermékenyülés utáni kísérletbe vonása nagy munkaszervezési feladatot igényel.
- Az embriók fejlődésének ellenőrzése rendkívül időigényes.
- A szomiták számának vizsgálata 17 hpf után szinte lehetetlen, az embriók aktív mozgása miatt.
- Informatív lehet a lárvák kelési idejében történő változás az egyes kezelések esetében.
- Probléma lehet a vizsgált anyag ikrahéjon való átjutása.

ALGASZÁMNÖVEKEDÉS- GÁTLÁSI VIZSGÁLAT

- A vizsgálat célja, hogy valamely anyagnak az egysejtű zöldalga fajok növekedésére gyakorolt hatását meghatározzuk. Viszonylag rövid idejű (72 órás) vizsgálatokkal is több nemzedéken keresztül figyelhetők meg a hatások. A módszer több, egysejtű algafajjal való használatra is adaptálható
- vízben jól oldódó vizsgált anyagokra alkalmazható, amelyek közvetlenül nem akadályozzák az alga növekedésének mérését

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK ÉS MÉRTÉKEGYSÉGEK

- Sejtsűrűség: sejtek száma milliliterenként;
- Növekedés: a sejtsűrűség növekedése a vizsgálat időtartama alatt;
- Növekedési sebesség: a sejtsűrűség növekedése egységnyi idő alatt;
- EC50: e módszerben azon vizsgált anyag koncentrációja, amely 50 %-os csökkenést eredményez a növekedésben (EbC50) vagy a növekedési rátában (ErC50) a kontrollhoz viszonyítva;
- NOEC (megfigyelhető hatást nem okozó koncentráció): e módszerben az a legnagyobb vizsgált koncentráció, amelynél jelentős növekedésgátlás nem figyelhető meg a kontrollhoz viszonyítva.
- A vizsgált anyag minden koncentrációját tömeg/térfogat (milligramm/liter) mértékegységben kell megadni. E koncentrációk tömeg/tömeg ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) mértékegységben is megadhatók.

A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

- Végrehajtható határérték-vizsgálat 100 mg/liter koncentrációval annak bemutatására, hogy az EC50 nagyobb, mint e koncentráció.
- A kiválasztott zöldalgafaj exponenciálisan növekvő sejtkultúráit több nemzedéken keresztül meghatározott körülmények között kezelik a vizsgált anyag különféle koncentrációival.
- A vizsgált oldatokat 72 órás időtartamig kell inkubálni, amelynek során legalább minden 24 órában meg kell mérni a sejtsűrűséget minden egyes oldatban. A növekedésgátlást a kontrolltenyészethez viszonyítva kell meghatározni.

MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

- A kontrolltenyészetekben a sejtsűrűségnek legalább 16-szorosára kell növekednie 3 napon belül. A vizsgált anyag koncentrációit a kísérlet során mindvégig a kezdeti koncentráció 80 %-án belüli értéken kell tartani.
- Bizonyítani kell, hogy a koncentrációk a vizsgálat során mindvégig megmaradnak. Koncentrációk mérésével a vizsgálati időtartam kezdetén és végén => jelentős mennyiségű vizsgált anyag épülhet be az algabiomasszába a vizsgálat időtartama során.

- Oldószer max 100mg/l (kontroll!), ultraszonikátor használható
- A vizsgálatot a pH-érték beállítása nélkül kell végrehajtani. Ha létezik bizonyíték a pH-érték jelentős változására, ajánlatos a vizsgálat megisméltése a pH-érték beállításával. Ezt a pH beállítást úgy kell végrehajtani, hogy ne változzon meg jelentős mértékben a vizsgált anyag koncentrációja a törzsoldatban.
- A hígítóvíznek jó minőségű desztillált víznek vagy $5 \mu\text{S cm}^{-1}$ -nél kisebb vezetőképességű, ioncserélt víznek kell lennie. A víz desztillálásához használt készüléknek semmilyen rézből készült alkatrészt nem szabad tartalmaznia.
- Speciális készülékek, tartási körülmények

A kísérlet végrehajtása

- Az előzetes vizsgálatok eredményei alapján kell meghatározni azt a koncentrációtartományt, amelyben a hatások valószínűleg bekövetkeznek.
- Kezdeti sejtsűrűség körülbelül 10^4 sejt/ml
- legalább 5 koncentrációt kell mértani sorba állítani, a vizsgált legalacsonyabb koncentrációnak nem szabad megfigyelt hatással lennie az alga növekedésére. A vizsgált legnagyobb koncentrációnak a kontrollhoz viszonyítva legalább 50 %-kal kell gátolnia, és lehetőleg teljesen meg kell gátolnia a növekedést.
- Három ismétlést kell tartalmaznia minden egyes vizsgált koncentrációnál. Három kontrollt kell vizsgálni a vizsgált anyag nélkül, és ha van ilyen, három, a segédanyagot tartalmazó kontrollt is kell vizsgálni.

- A vizsgálat kezdete után legalább a 24., 48. és 72. órában, meg kell határozni a sejtsűrűséget.
- A pH-t a vizsgálat kezdetén és a 72. órában kell mérni. A kontrollok pH-jának általában nem szabad 1,5 egységnél nagyobb mértékben eltérnie a vizsgálat során.

JELENTÉS

- A vizsgálati jelentésnek lehetőség szerint az alábbi információkat kell tartalmaznia:
- — vizsgált anyag: kémiai azonosító adatok,
- — vizsgált organizmusok: eredet, laboratóriumi tenyészet, törzsszám, tenyésztés módszere,
- — vizsgálati körülmények:
- — vizsgálat kezdetének és befejezésének időpontja és időtartama,
- — hőmérséklet,
- — tápoldat összetétele,
- — a tenyésztéshez használt készülékek,
- — az oldatok pH-ja a vizsgálat kezdetén és végén (magyarázatot kell adni, ha 1,5 egységnél nagyobb pH-eltérés figyelhető meg),
- — a vizsgált anyag oldhatóvá tételére használt segédanyag és módszer, valamint a segédanyag koncentrációja a vizsgált oldatokban,

- — a fény intenzitása és minősége,
- — vizsgált koncentrációk (mért és névleges),
- — eredmények:
- — sejtsűrűség minden lombik esetében, minden egyes mérési pontban és a sejtsűrűség mérési módszere,
- — átlagos sejtsűrűség,
- — növekedési görbék,
- — koncentráció-hatás összefüggés grafikus ábrázolása,
- — EC-értékek és a számítás módszere,
- — NOEC,
- — egyéb megfigyelt hatások.

LEMNA SP. NÖVEKEDÉSGÁTLÁSI VIZSGÁLATA

- A vizsgálati módszer különböző anyagok által a Lemna (békalencse) nemzetséghez tartozó édesvízi növényekre kifejtett toxikus hatás meghatározására szolgál.
- A módszer egyenértékű az OECD TG 221 (2006) jelű vizsgálatával. Az európai uniós hatóságok széles körben egyetértenek abban, hogy az erősen színezett anyagok esetében a Lemna-vizsgálat megfelelő módon helyettesíti az algákon végzett vizsgálatot.
- Lemna gibba és Lemna minor

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

- Élőanyag-tömeg: a populációban lévő élő anyag száraz tömege. A vizsgálat során az élőanyag-tömeg helyett jellemzően helyettesítő mennyiségeket, például levélszámot vagy levélterületet mérünk, és ezekre a helyettesítő mennyiségekre is „élőanyag-tömegként” hivatkozunk.
- Klorózis: a levélszövet sárgulása.
- Klón: egy adott egyedből ivartalan szaporodással létrejövő szervezet vagy sejt. Az azonos klónhoz tartozó egyedek tehát genetikai szempontból azonosak.
- Telep: egymáshoz kapcsolódó anya- és leánylevelek (általában 2–4) összessége. Néha növénynek is nevezik.
- EC_x: a vizsgálati oldatban feloldott vizsgált anyag azon koncentrációja, amely adott expozíciós idő alatt a Lemna növekedésének x %-os (például 50 %-os) csökkenését okozza (az expozíciós időt külön meg kell adni, ha eltér a vizsgálat rendes vagy teljes időtartamától). Hogy egyértelmű legyen, hogy az EC értékét a növekedési sebességből vagy a kihozatalból nyertük-e, növekedési sebesség esetén „ErC”-t, kihozatal esetén „EyC”-t írunk, majd ezt követően megadjuk a mérési változót, például: „ErC (levélszám)”.

- *Átfolyásos vizsgálat:* olyan vizsgálat, amelynek során a vizsgálati oldatot folyamatosan cseréljük.
- *Levél:* a békalencse növény egyetlen különálló, „levélszerű” struktúrája. Ez a szaporodásra képes legkisebb egység (egyed).
- *Púposság:* púpos vagy duzzadt megjelenést mutató levelek.
- *Növekedés:* a vizsgálat ideje alatt a mérési változóban (például a levélszámban, a száraz tömegben, a nedves tömegben vagy a levélterületben) bekövetkező növekedés.
- *Növekedési sebesség* (átlagos fajlagos növekedési sebesség): az élőanyag-tömeg logaritmikus növekedése az expozíciós idő alatt.
- *Észlelhető hatást okozó legkisebb koncentráció (LOEC):* az a legkisebb vizsgált koncentráció, amely mellett adott expozíciós idő alatt az anyag statisztikailag szignifikáns mértékben ($p < 0,05$) csökkenti a növekedést a kontrolltenyészetéhez képest. Az LOEC felett ugyanakkor minden koncentrációnak legalább akkora káros hatást kell eredményeznie, mint amelyet az LOEC okoz. Ha ez a két feltétel nem elégíthető ki, az LOEC (és így az NOEC) megválasztását részletesen indokolni kell.

- *Mérési változók*: minden olyan változó, amelyet a vizsgálat végpontjának egy vagy több különböző hatásváltozó segítségével történő kifejezése érdekében mérünk. Ebben az eljárásban mérési változó a levélszám, a levélterület, a nedves tömeg és a száraz tömeg.
- Monokultúra: egyetlen növényfajból álló tenyészet.
- Nekrózis: elhalt (például fehér vagy vízzel átitatott) levélszövet.
- Észlelhető hatást még nem okozó koncentráció (NOEC): az a vizsgált koncentráció, amely közvetlenül az LOEC alatt helyezkedik el.
- Fenotípus: az élőlény észlelhető, génjei és a környezet kölcsönhatása által meghatározott jellemzői.
- Hatásváltozók: a toxikus hatás becslésére szolgáló, az élőanyag-tömeget leíró mérési változókból különböző számítási módszerekkel származtatott változók. Ebben az eljárásban hatásváltozó a növekedési sebesség és a kihozatal, amelyeket a levélszámból, a levélterületből, a nedves tömegből és a száraz tömegből mint mérési változókból származtatunk.

- Félstatikus (oldatcserés) vizsgálat: olyan vizsgálat, amelynek során a vizsgálati oldatot bizonyos időközönként lecseréljük.
- Statikus vizsgálat: olyan vizsgálat, amelynek során a vizsgálati oldatot nem cseréljük le.
- A vizsgálat végpontja: az az általános jellemző, amelyre a vizsgálat irányul, és amely a vizsgált vegyület hatására a kontrolltenyészethez képest megváltozik. Ebben az eljárásban a vizsgálat végpontja a növekedésgátlás, amely különböző, egy vagy több mérési változóból származtatott hatásváltozók segítségével fejezhető ki.
- Vizsgálati oldat: az a teljes, szintetikus tápoldat, amelyben a vizsgált növények a vizsgált anyag jelenlétében növekednek. A vizsgált anyag általában oldott formában van jelen a vizsgálati oldatban.
- Kihozatal: az élőanyag-tömeget leíró mérési változó értéke az expozíciós idő végén, mínusz ugyanezen változó értéke az expozíciós idő kezdetén.

A VIZSGÁLAT ÉRVÉNYESSÉGE

- A vizsgálat akkor érvényes, ha a kontrolltenyészetben a levélszám megkettőződési ideje 2,5 napnál (60 óránál) kisebb, ami hét nap alatt körülbelül hétszeres növekedést, illetve $0,275$ 1/nap átlagos fajlagos növekedési sebességet jelent.
- A végleges toxicitási vizsgálatnak általában öt, egymással mértani sorozatot alkotó vizsgálati koncentrációra kell kiterjednie.
- Megfelelő tartási körülmények...
- A vizsgálat a növények vizsgálati edényekbe helyezése után 7 nappal fejeződik be.

Mérések és analitikai vizsgálatok

- A vizsgálat kezdetén meg kell számlálni a vizsgálati edényekben lévő leveleket, és az értéket fel kell jegyezni a mérési jegyzőkönyvben; a számlálás során ügyelni kell arra, hogy a kiálló, vizuálisan elkülönülő leveleket vegyük figyelembe. A szabályszerűnek vagy rendellenesnek tűnő levelek számát a vizsgálat kezdetén, az expozíció időtartama alatt legalább háromnaponta (azaz a hét nap során legalább kétszer), valamint a vizsgálat végén kell meghatározni. Fel kell jegyezni a növények fejlődésében beálló változásokat.
- A vizsgálat során a levélszám mellett a vizsgált anyagnak a következő mérési változók közül legalább egy továbbira gyakorolt hatását is meg kell határozni.
 - i. a levelek összterülete;
 - ii. száraz tömeg;
 - iii. nedves tömeg.

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS

Számolt értékek:

- Megkettőződési idő
- átlagos fajlagos növekedési sebesség
- kihozatal
- A koncentráció–hatás görbék elkészítése

- *Vizsgált anyag:*
- –fizikai jelleg és fizikokémiai tulajdonságok, vízben való oldhatósági határ,
- –kémiai azonosító adatok (pl. CAS-szám), tisztaság.
- *Vizsgált faj:*
- –tudományos név, klón (ha ismert) és eredet.
- *Vizsgálati körülmények:*
- –alkalmazott vizsgálati eljárás (statikus, félstatikus vagy átfolyásos),
-
- –a vizsgálat megkezdésének időpontja és időtartama,
-
- –vizsgálati oldat,
-
- –a kísérleti terv ismertetése: vizsgálati edények és fedők, oldattérfogatok, telep- és levélszámok vizsgálati edényenként
- a vizsgálat megkezdésekor,

- –vizsgált koncentrációk (szükség szerint névleges és mért értékek) és a párhuzamos tenyészetek száma
- koncentrációnként,
-
- –a törzs- és a vizsgálati oldatok elkészítésének módszere, az esetleg alkalmazott oldó- vagy diszpergálószer,
-
- –hőmérséklet a vizsgálat folyamán,
-
- –fényforrás, a fény intenzitása és homogenitása,
-
- –a vizsgálati és a kontrolloldatok pH-értékei,
- –a vizsgált anyag koncentrációi és az analízis módszere a megfelelő minőség-ellenőrzési adatokkal együtt (az
- érvényesség vizsgálata, a szórás vagy az analízis konfidenciahatára),
-
- –a levélszám és a további mérési változók (száraz tömeg, nedves tömeg vagy levélterület) meghatározásának módszere,
-
- –a jelen vizsgálati módszertől való esetleges eltérések.

- *Eredmények:*
- –nyers mérési adatok: levélszám és a további mérési változók minden egyes vizsgálati és kontrolltenyészetben
- minden adatfelvételkor és analízis alkalmával,
- –az egyes mérési változók középértékei és szórásai,
-
- –növekedési görbék minden egyes koncentrációra (logaritmikusan transzformált mérési változókkal ajánlott
- megadni, lásd a 2.2.1. szakasz második bekezdését),
- –megkettőződési idő, illetve növekedési sebesség a kontrolltenyészetben, a levélszám alapján,
- –hatásváltozók számított értéke minden párhuzamos tenyészetre, továbbá vizsgálati csoportonként a középérték
- és a szórásnégyzet,
-
- –a koncentráció–hatás összefüggés grafikus formában,

- –a hatásváltozók toxikus végpontjának becsült értékei, például EC50, EC10, EC20 és a hozzájuk tartozó konfidencia-intervallumok.
- Ha kiszámítottuk, az LOEC, illetve az NOEC értéke, továbbá a számításhoz alkalmazott statisztikai módszer,
-
- –ANOVA alkalmazása esetén a hatás kimutatásának mérethatára (például a legkisebb szignifikáns különbség),
- –a vizsgálatok során észlelt esetleges növekedésserkentés,
-
- –fitotoxicitásra utaló esetleges látható jelek, valamint a vizsgálati oldatokkal kapcsolatos észrevételek,
-
- –az eredmények szöveges összefoglalása és értékelése, ezen belül a jelen vizsgálati módszertől való eltérések vizsgálati eredményekre gyakorolt hatásának elemzése.

DAPHNIA-FAJOK AKUT IMMOBILIZÁCIÓS VIZSGÁLATA

- Ennél a tesztnél *Daphnia magna* és *Daphnia pulex* fajokat lehet használni.
- Ez az akut immobilizációs vizsgálati módszer egyenértékű az OECD TG 202 (2004) módszerrel. Elvégzéséhez rendelkezésre áll megfelelő magyar szabvány is: MSZ EN ISO 6341.
- Ez a módszer egy akut toxicitási vizsgálatot ír le, amely a vegyi anyagok Daphniákra gyakorolt hatását értékeli.
- A fiatal Daphniákat, melyek a vizsgálat kezdetén 24 órásnál fiatalabbak, a vizsgált anyag különböző koncentrációinak teszik ki 48 órás időtartamon át. Az immobilizálást 24 és 48 óra elteltével rögzítik, és összehasonlítják a kontrollértékekkel. Az eredményeket elemzik a 48 órás EC50 kiszámítása végett. A 24 órás EC50 meghatározása opcionális.

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

- Ezzel a módszerrel összefüggésben a következő meghatározásokat alkalmazzuk:
- **EC50**: az a becsült koncentráció, amely a Daphniák 50 %-át mozgásképtelenné teszi valamely meghatározott expozíciós időtartamon belül. Amennyiben más meghatározás kerül alkalmazásra, arról be kell számolni, a referenciájával együtt.
- Mozgásképtelenség: Azokat az állatokat, amelyek a vizsgálati tartály óvatos megkeverése után 15 másodpercen belül nem képesek úszni, mozgásképtelennek kell tekinteni (még akkor is, ha a csápjaikat még tudják mozgatni)

MINŐSÉGI KRITÉRIUMOK

- A vizsgálat érvényességéhez az alábbi teljesítménykritériumoknak kell teljesülniük:
- — A kontrollokban, beleértve az szolubilizálószeret tartalmazó kontrollt, a Daphniák immobilizálási aránya nem haladhatja meg a 10 %-ot,
- — A vizsgálat végéig az oldott oxigén koncentrációja legyen ≥ 3 mg/l a kontrollban és a vizsgálati tartályokban.

Vizsgálati csoportok és kontrollok

- A vizsgálati tartályokat megfelelő mennyiségű hígítóvízzel és a vizsgálati anyag oldataival kell feltölteni. A tartályokban a levegő/víz aránya legyen azonos a vizsgálati és a kontrollcsoport esetében. Ezután a Daphniákat bele kell helyezni a vizsgálati tartályokba. Minden egyes vizsgálati koncentrációban és a kontrollokban legalább 20 állatot kell használni – lehetőleg négy, egyenként öt állatot tartalmazó csoportra osztva. Állatonként legalább 2 ml vizsgálati oldatot kell biztosítani (azaz vizsgálati tartályonként 10 ml mennyiséget öt Daphniára).
- Legalább öt vizsgálati koncentrációt használjunk. A legmagasabb vizsgált koncentráció eredményezzen lehetőleg 100 százalékos immobilizációt, a legalacsonyabb vizsgált koncentráció pedig lehetőleg ne okozzon megfigyelhető hatást.

- 24 és 48 órával a vizsgálat megkezdését követően minden vizsgálati tartályban ellenőrizni kell a mozgásképtelen Daphniákat. A mozgásképtelenség mellett minden rendellenes viselkedésről vagy jelenségről be kell számolni.

VIZSGÁLATI JELENTÉS

- A vizsgálati jelentésnek a következőket kell tartalmaznia:
- *Vizsgálati anyag:*
 - — fizikai jellege és fontos fizikai-kémiai tulajdonságai,
 - — kémiai azonosítási adatok, beleértve a tisztaságot.
- *Vizsgált fajok:*
 - — Daphniák faja és eredetük, szállító (ha ismert) és az alkalmazott tenyésztési körülmények (beleértve a forrást, táplálék fajtáját és mennyiségét, az etetés gyakoriságát).
- *Vizsgálati körülmények:*
 - — a vizsgálati tartályok leírása: a tartály típusa, az oldat térfogata, a Daphniák száma vizsgálati tartályonként, a vizsgálati tartályok száma (ismétlések) koncentrációnként,
 - — a törzsoldat és a vizsgált oldat elkészítésének módszere, beleértve bármilyen oldószer vagy diszpergálószer használatát, az alkalmazott koncentrációkat,
 - — a hígítóvíz adatai: forrás és vízminőségi jellemzők (pH-érték, keménység, Ca/Mg-arány, Na/K-arány, lúgosság, vezetőképesség, stb.); a művíz összetétele, amennyiben alkalmazták,
 - — inkubációs körülmények: hőmérséklet, fényintenzitás és periodicitás, oldott oxigén, pH-érték, stb.

Eredmények:

- — az immobilizált vagy más káros behatást mutató (beleértve a rendellenes viselkedést) Daphniák száma és százaléka a kontrollokban és az egyes kezelt csoportokban, minden egyes megfigyelési időpontban, és a megfigyelt hatások jellegének leírása,
- — ha rendelkezésre áll, a referenciaanyaggal végzett vizsgálat eredményei és dátuma,
- — a névleges vizsgálati koncentrációk és a vizsgálati tartályokban lévő vizsgálati anyagok koncentrációinak meghatározására végzett valamennyi analízis eredménye; a módszer visszanyerési hatékonyságáról és a meghatározás korlátjáról is beszámolva,
- — vizsgálat során végzett összes hőmérsékletre, pH-értékre és oldott oxigénre vonatkozó fizikai-kémiai mérés,
- — immobilizációs EC50 48 óránál, konfidenciaintervallumokkal, és a számításaikhoz használt illesztett modellek grafikonjai, a dózisreakció-görbék meredeksége, és standard hibája; az EC50 meghatározásához használt statisztikai eljárások; (ha mérték, ezeket az adatokat a 24 órás immobilizálásra is meg kell adni)
- — a vizsgálati módszertől való bármilyen eltérés magyarázata, illetve annak magyarázata, hogy az eltérés befolyásolta-e a vizsgálati eredményeket.

Hosszútávú halas tesztek

- 96 óránál hosszabb tesztek
- Az élelciklus bizonyos részein, vagy teljes élelcikluson keresztül történik
- Több paraméter vizsgálható, komplexen
- Alapjaiban hasonlít a rövidtávú tesztekhez
- Nagyon alacsony tesztanyag koncentrációk használata
- Nehéz kivitelezhetőség, nagy laborigény
- (nagyfokú kreativitás...)

Timeline	Test Day	# Organisms	Endpoints
Month 1	P Hatching Success Day 0-7	200 per concentration 100 per replicate 50 per incubation cup	P hatching success Embryo time-to-hatch
	P Larval Exposure (Early Life-Stage) Day 7-35	100 per concentration 50 per replicate 25 per growth chamber	P survival Lengths
Month 2, 3	P Juvenile Exposure Day 35-90	100 per concentration 50 per replicate	P survival Time to maturity Sex ratio Male, female length and weight GSI 2° sex characteristics Whole body homogenate biomarkers Histopathology
Month 3	P Reproduction Phase Day 90-104	32 males/20 females per concentration 16 males/10females per replicate	Time to maturity Sex ratio 2° sex characteristics Pre-spawn condition Fecundity (eggs/female) Fertilization success Spawning behavior
	P Adult Termination Day 104	Survivors	Male, female length and weight GSI Whole body homogenate biomarkers Histopathology
Month 3	F1 Hatching Success Day 90-111	200 embryos per concentration 100 per replicate 50 per incubation cup	F1 hatching success Embryo time-to-hatch
Month 4	F1 Larval Exposure (Early Life-Stage) Day 97-139	100 larval fish per concentration 50 per replicate 25 per growth chamber	F1 survival Length

Timeline	Test Day	# Organisms	Endpoints
Month 5	F1 Juvenile Exposure Day 125-178	100 per concentration 50 per replicate	F1 survival Time to maturity Sex ratio Male, female length and weight GSI 2° sex characteristics Whole body homogenate biomarkers Histopathology
Month 6	F1 Reproduction Phase Day 178-192	32 males/20 females per concentration 16 males/10females per replicate	Time to maturity Sex ratio 2° sex characteristics Pre-spawn condition Fecundity (eggs/female) Fertilization success Spawning behavior
	F1 Adult Termination Day 192	Survivors	Male, female length and weight GSI Whole body homogenate biomarkers Histopathology
Month 7	F2 Hatching Success Day 178-199	200 embryos per concentration 100 per replicate 50 per incubation cup	F2 hatching success Embryo time-to-hatch
	F2 Larval Exposure (Early Life-Stage) Day 206-227	100 larval fish per concentration 50 per replicate 25 per growth chamber	F2 survival Length Weight

Ivari dimorfizmus (másodlagos nemi jelleg)



1. Males snout comes evenly to a rounded point, females snout comes to a small concave before coming to a sharper rounded point than the males.
2. Males fins show small "spines" and his body appears sort of 'furry'
3. Body of male curves evenly inwards from widest point (4) behind the head, while females body curves slightly outward from the head, making widest point of body just behind the pectoral fins.



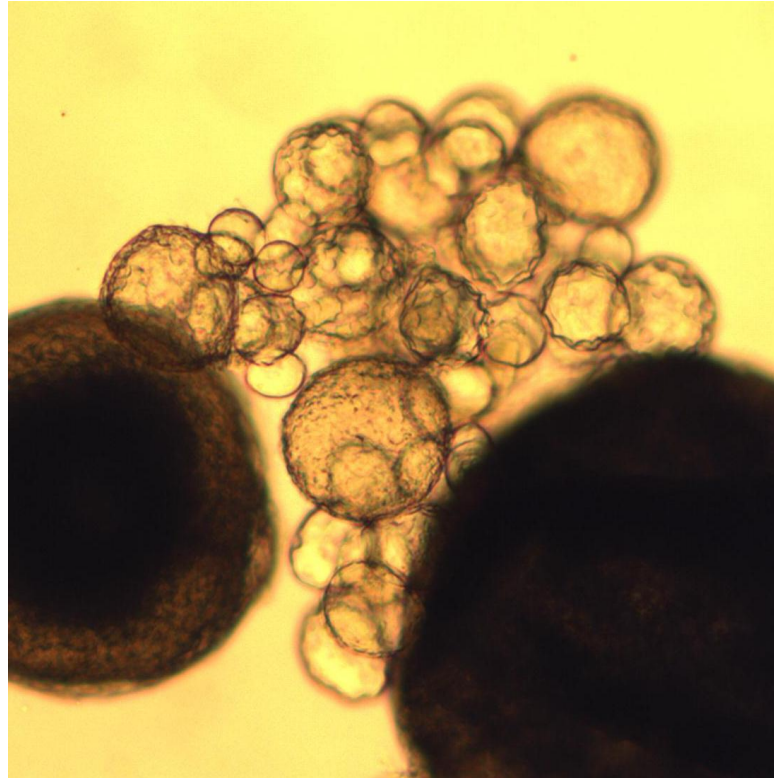
Petefészek, oogenezis

- A valódi csontoshalaknál (*Teleostei*) az egyedfejlődés (ontogenezis) kezdetén az ivarszervek, más gerincesekhez hasonlóan, a gononephrotom ventromedialis részéről ventrális irányban megjelenő hosszanti kettőzetből, a genitális redőből indulnak fejlődésnek. Ebben a kettőzetben helyezkednek el az ősvarsejtek

- A zebradánió petefészke páros szerv, amit a hasüreg zár körbe. A petefészket az ivarnyílással a petevezető köti össze. A különböző fejlődési állapotú folliculusok véletlenszerűen helyezkednek el a petetartó lemezekon.

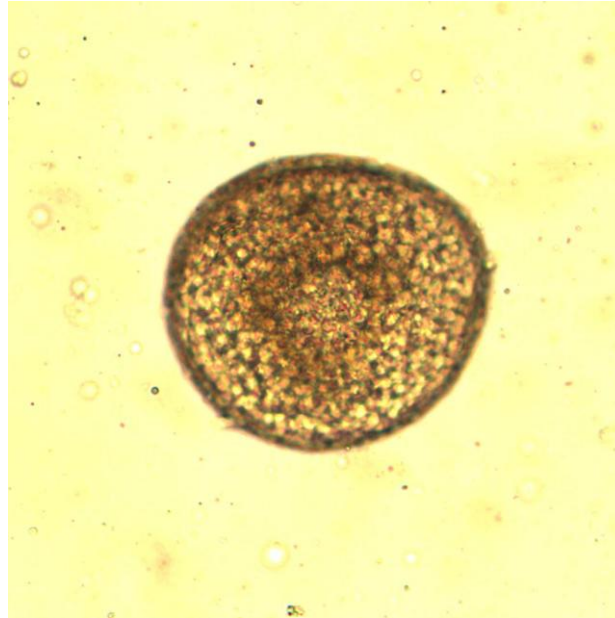
- A petefejlődés egyes szakaszainak jellemzése, a fejlődési stádiumok elkülönítése többféle szempont alapján lehetséges.
- A főbb oocyta fejlődési stádiumok a legtöbb csontoshalnál azonosak. A főbb fejlődési állapotok: az oogóniumok mitotikus osztódása és átalakulása elsőrendű oocytává, a follikuláris sejtek megjelenése, a kortikális alveólusok kialakulása (elhelyezkedése és alakja), a vitellogenezis és az oocyták végső érésének folyamata.

I stádium



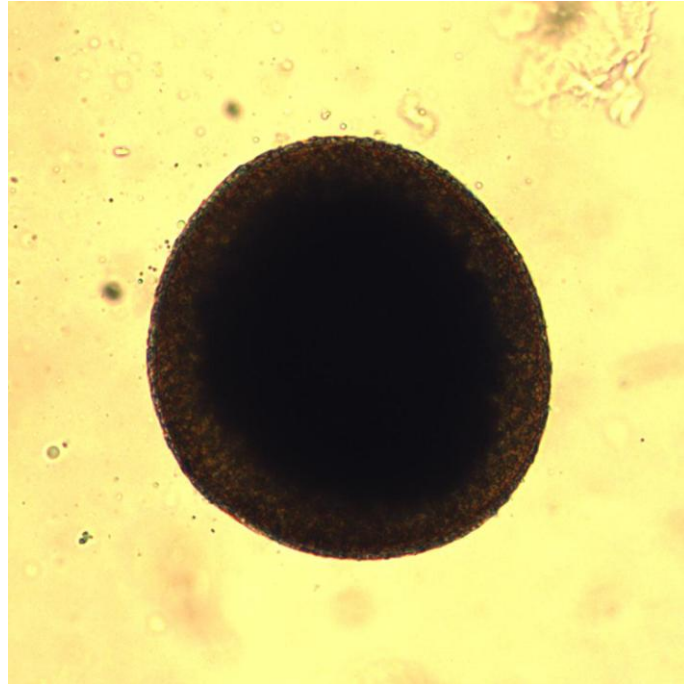
Az elsődleges növekedés fázisában a folliculusok átmérője 7-140 μm közötti. A folliculusok átlátszóak, megfigyelhetőek bennük a sejtmagok. A sejtmag a citoplazmához képest nagy, sokszor nehéz elkülönült citoplazmát tartalmazó részt megfigyelni.

II stádium



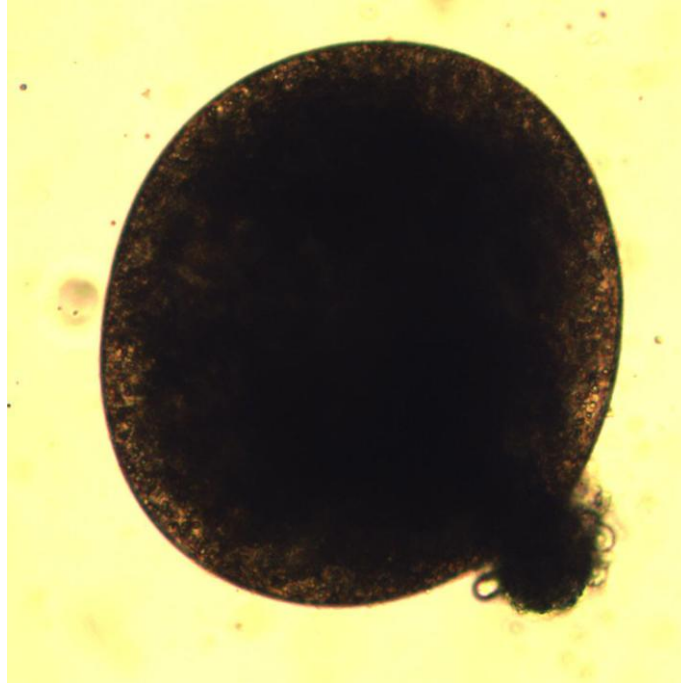
- A kortikális alveolus stádiumban a folliculusok átmérője 0,14-0,34 mm közötti. Ennek a stádiumnak a kezdetét a kortikális alveólusok megjelenése jelzi az oocytán belül. Ahogy a folliculus mérete nő és a kortikális alveólusok száma növekszik, az oocyta egyre opálosabbá válik, és a középén elhelyezkedő germinális vezikulumot egyre nehezebb megfigyelni.

III. stádium



- A vitellogenezis stádiumában 0,34-0,69 mm átmérőjűek a folliculusok, és egyre opálosabbá válnak, a germinális vezikulum is teljesen kivehető lesz. Ebben a stádiumban az oocyták elsősorban a szikanyagok beépülése miatt látványos méretbeli növekedésen mennek keresztül.

IV. stádium



- A maturáció stádiumában lévő folliculusok átmérője 0,69-0,73 mm. A maturáció előtti folliculus opálos és néha nehéz, de nem lehetetlen megfigyelni benne a germinális vezikulumot. Strukturális változások mennek végbe a szikben ebben a stádiumban: a szikszemcsék elveszik kristályos szerkezetüket és homogénekké válnak.

V stádium

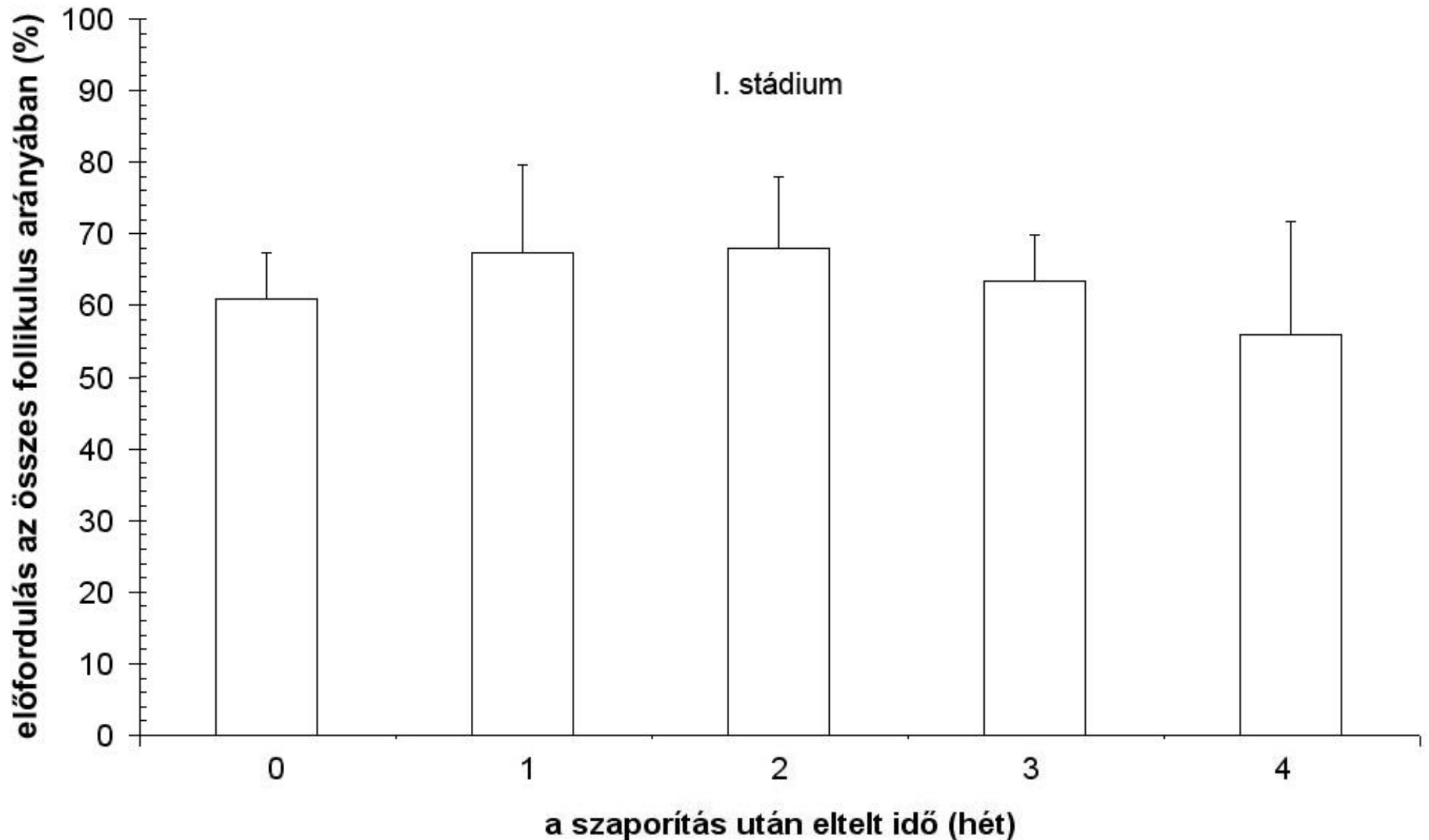


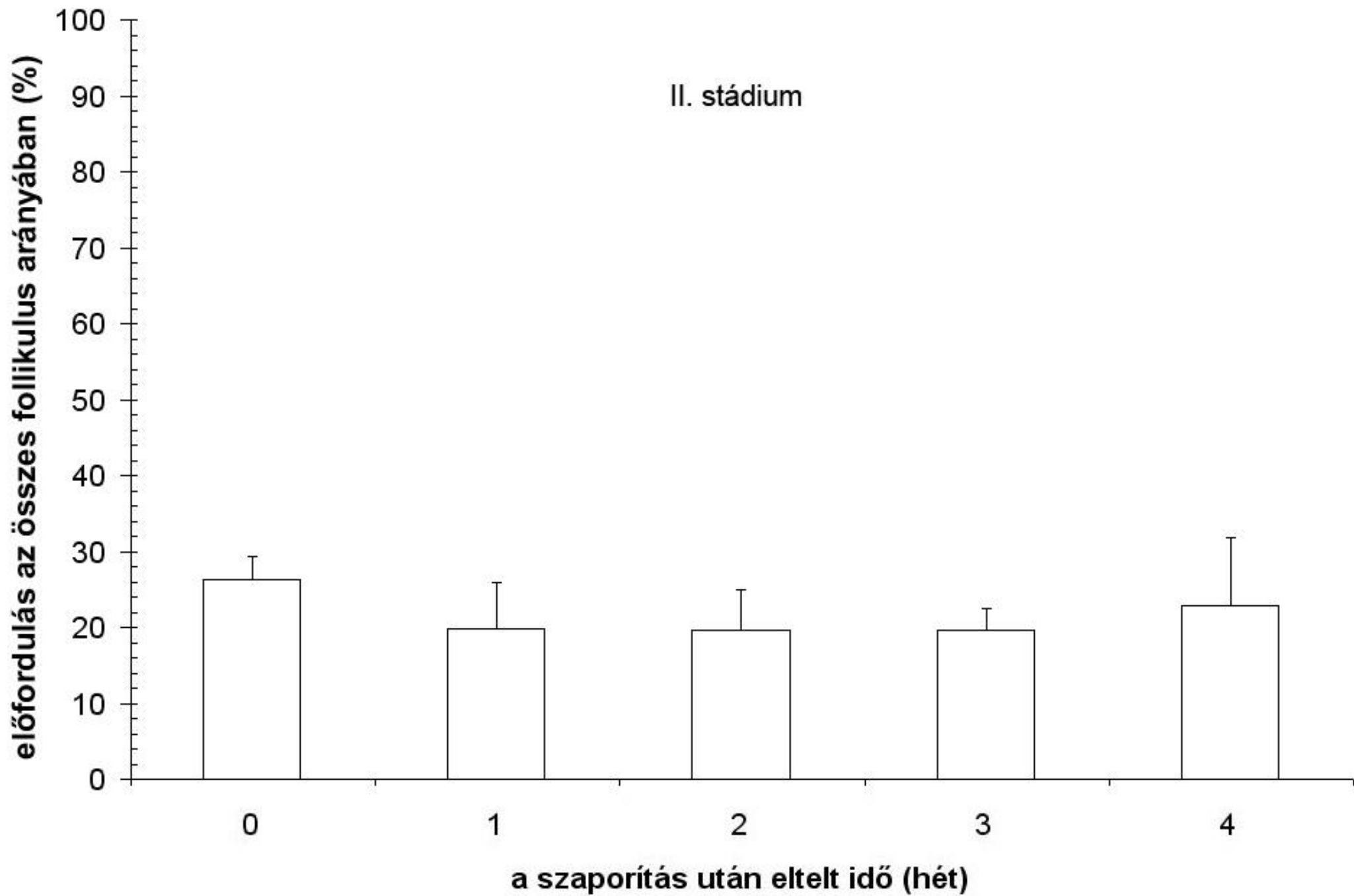
- Az érett ikra 0,73-0,75 mm átmérőjű, és áttetszőbb, mint a IV stádiumban lévő folliculusok. A kortikális alveólusok rétege az ikra cortexében találhatóak, közvetlenül a szikszemcsék felett.

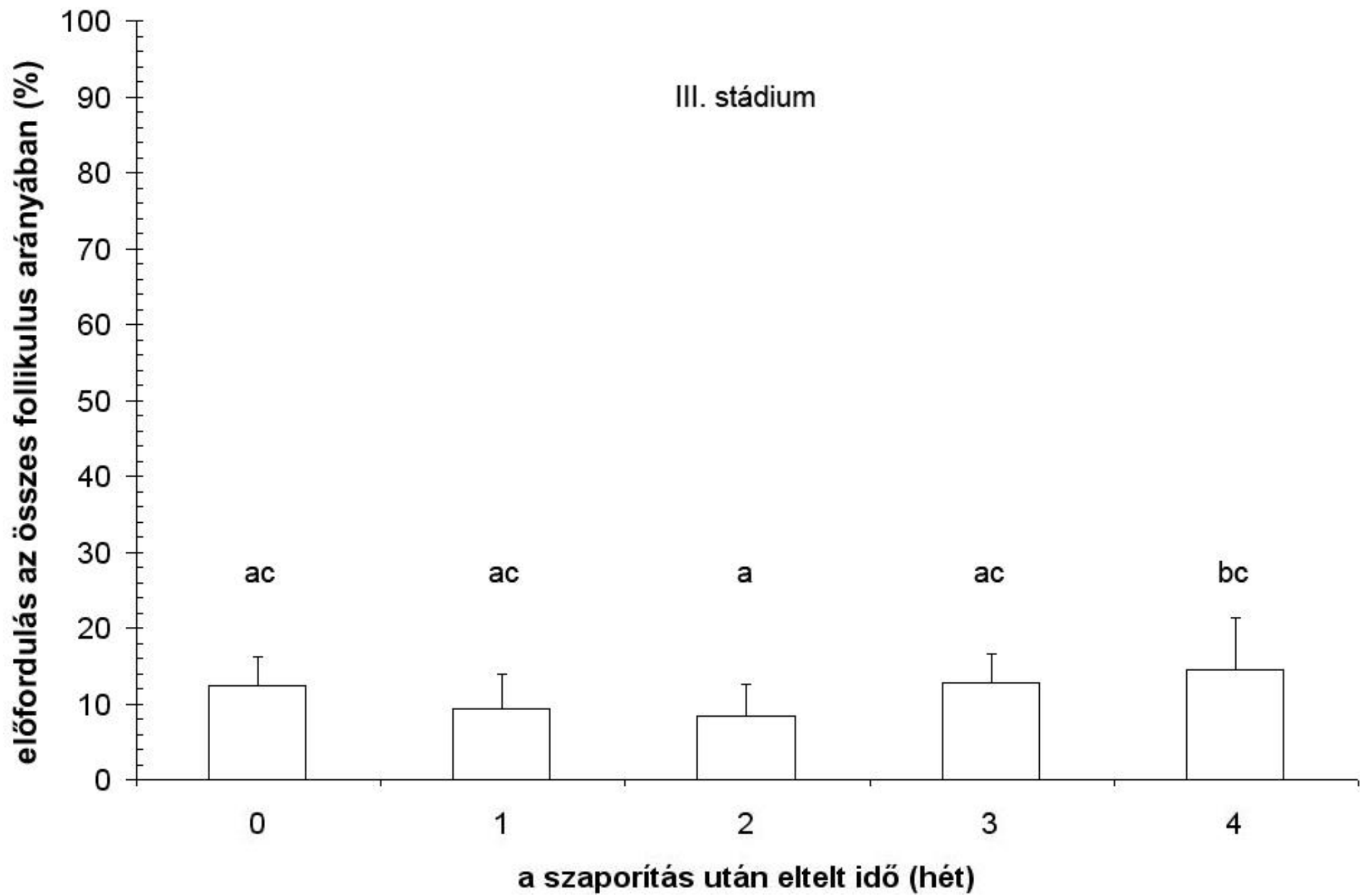
Petefejlődési típusok

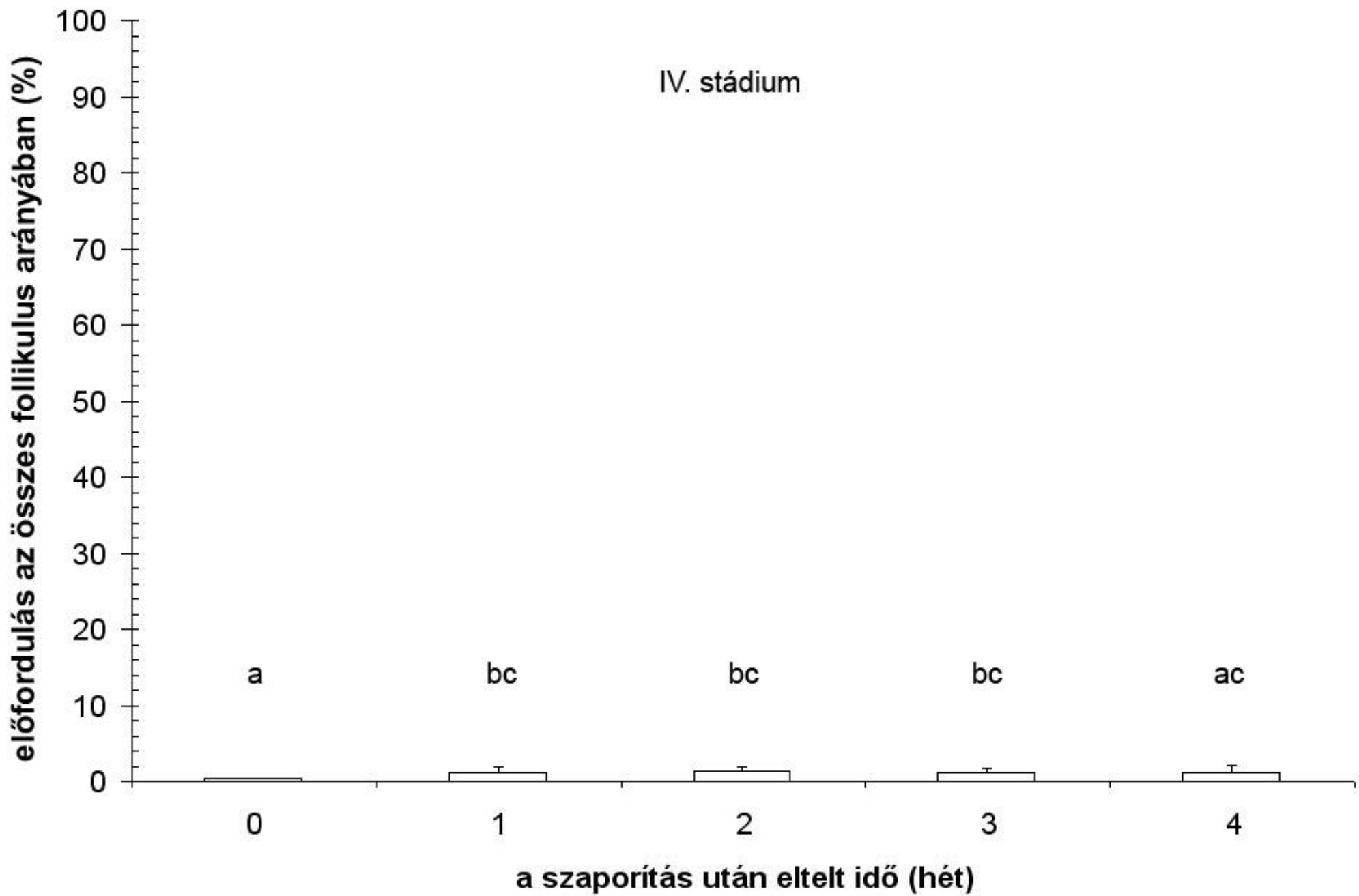
- Az első csoportba az életük során csak egyszer ívó fajok tartoznak. A petefészkekben az ívási ciklus során a petesejtek azonos stádiumban vannak, fejlődésük egyidejű.
- A második csoportba azok a fajok tartoznak, melyek petefészkében két vagy több olyan oocyta csoport található, melyek fejlődési fázisukban különböznek. Az ikrások fajtól és a környezeti feltételektől függően többször is ívhatnak a szaporodási időszakon belül.
- ***A harmadik csoportba melyek petefejlődése aszinkronizált, a petefészek oocytái különböző fejlődési fázisban vannak. Az azonos fejlődési állapotú petesejtek nem képeznek jól megkülönböztethető csoportokat a petefészken belül. A viszonylag hosszú szaporodási időszakon belül az ikrások meghatározott időközönként ovulálnak és ívnak.***

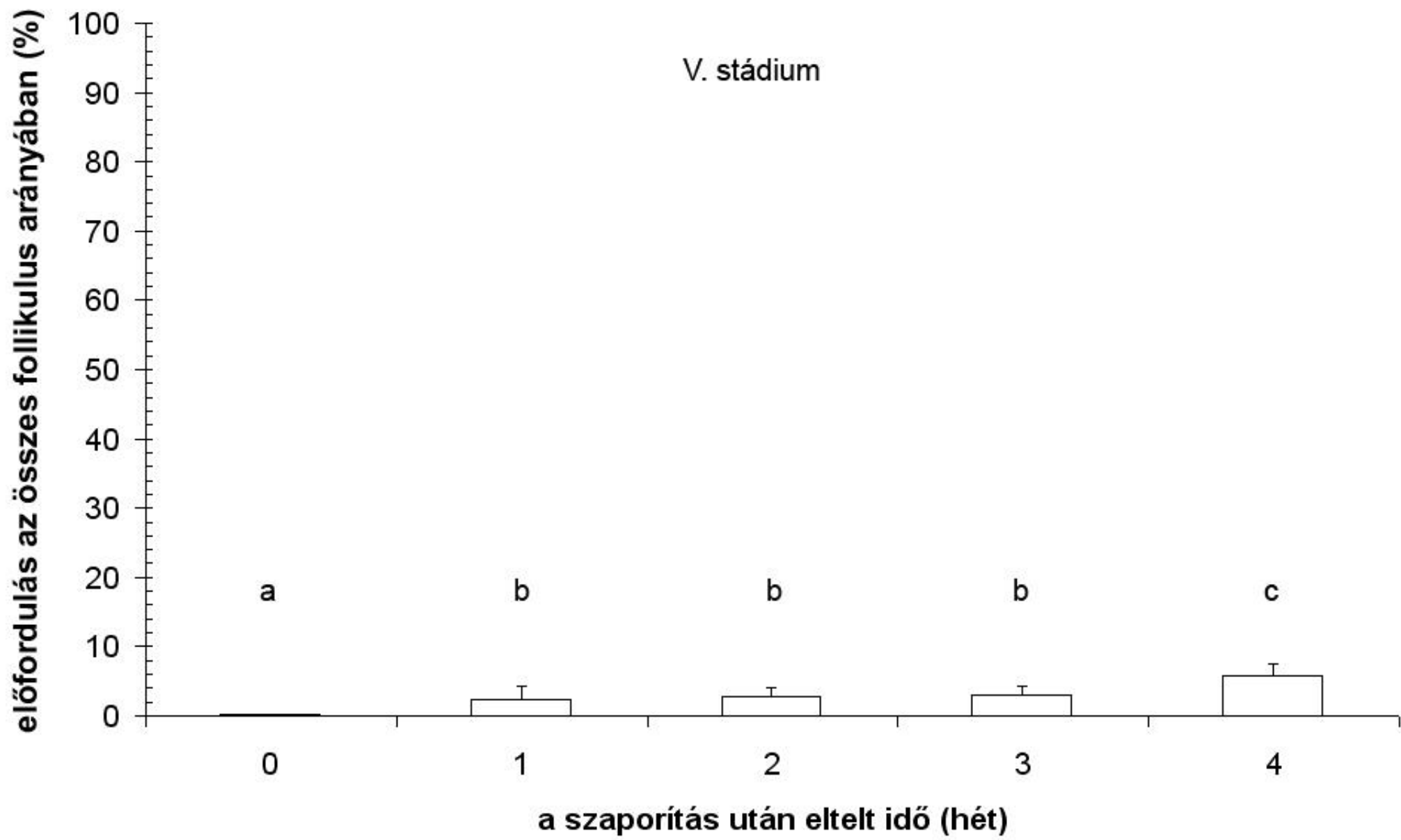
Az különböző fejlődési stádiumú follikulusok részaránya a petefészekben





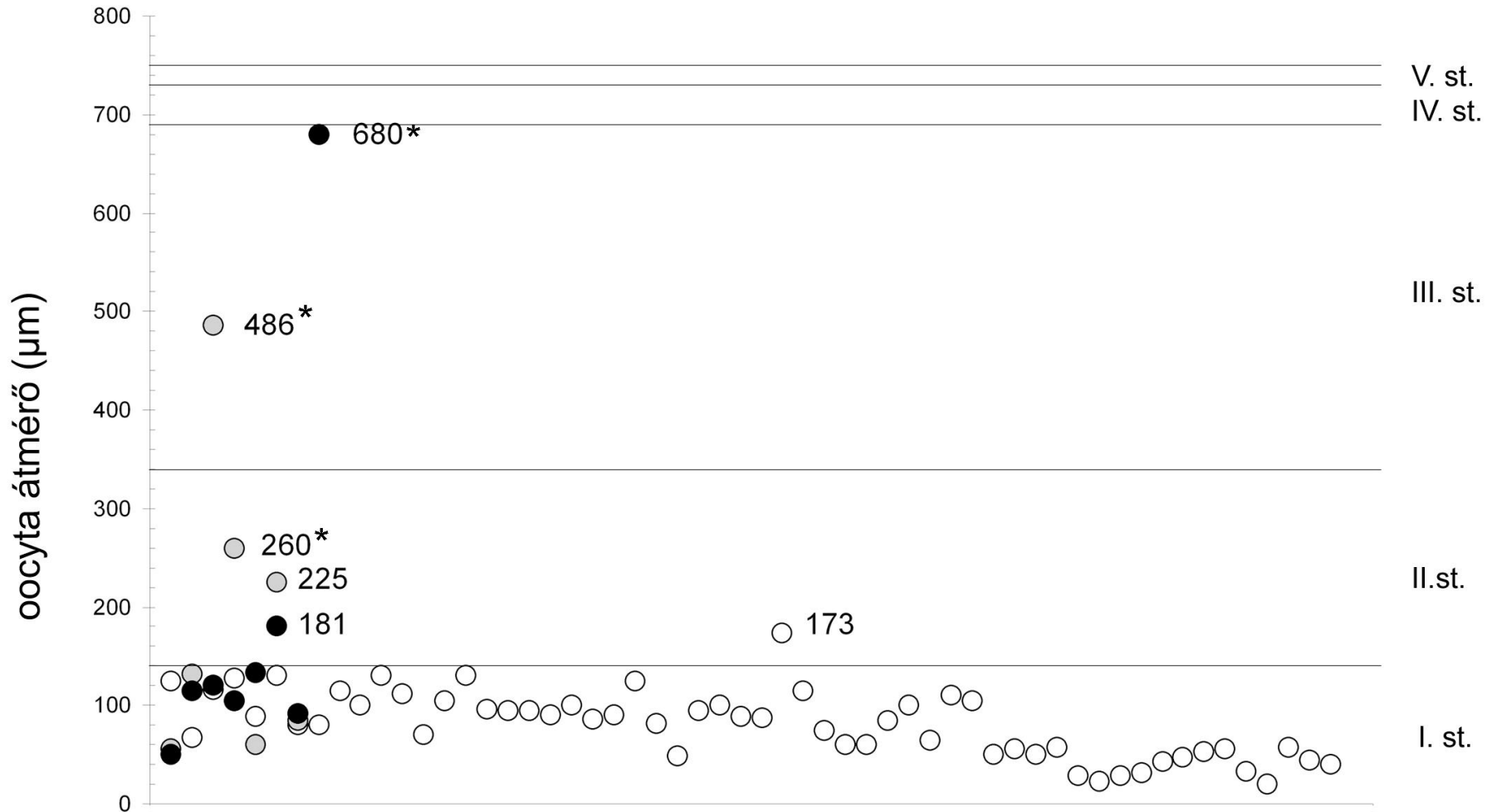






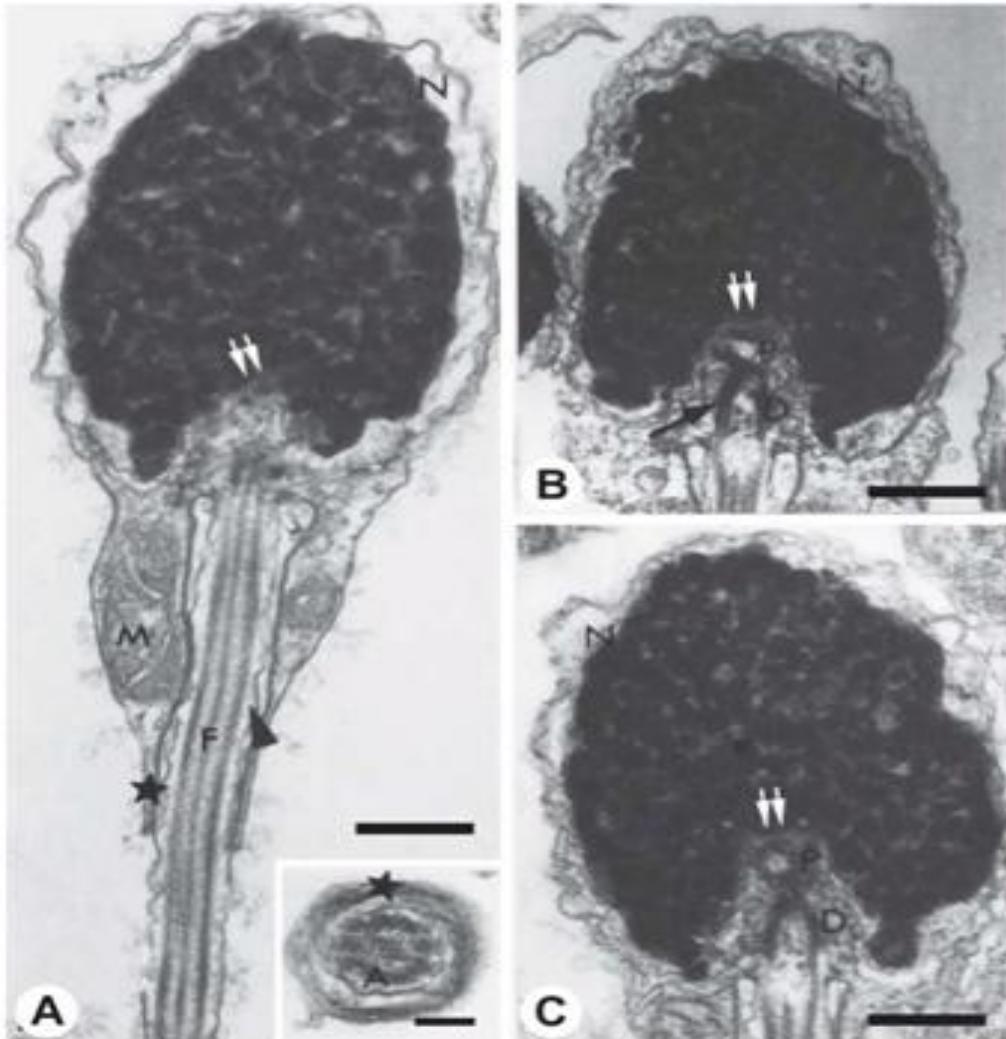
Follikulus- fejlődési ütem

- donor oocyták
- ◐ donor oocyták egy héttel a beültetés után
- donor oocyták két héttel a beültetés után



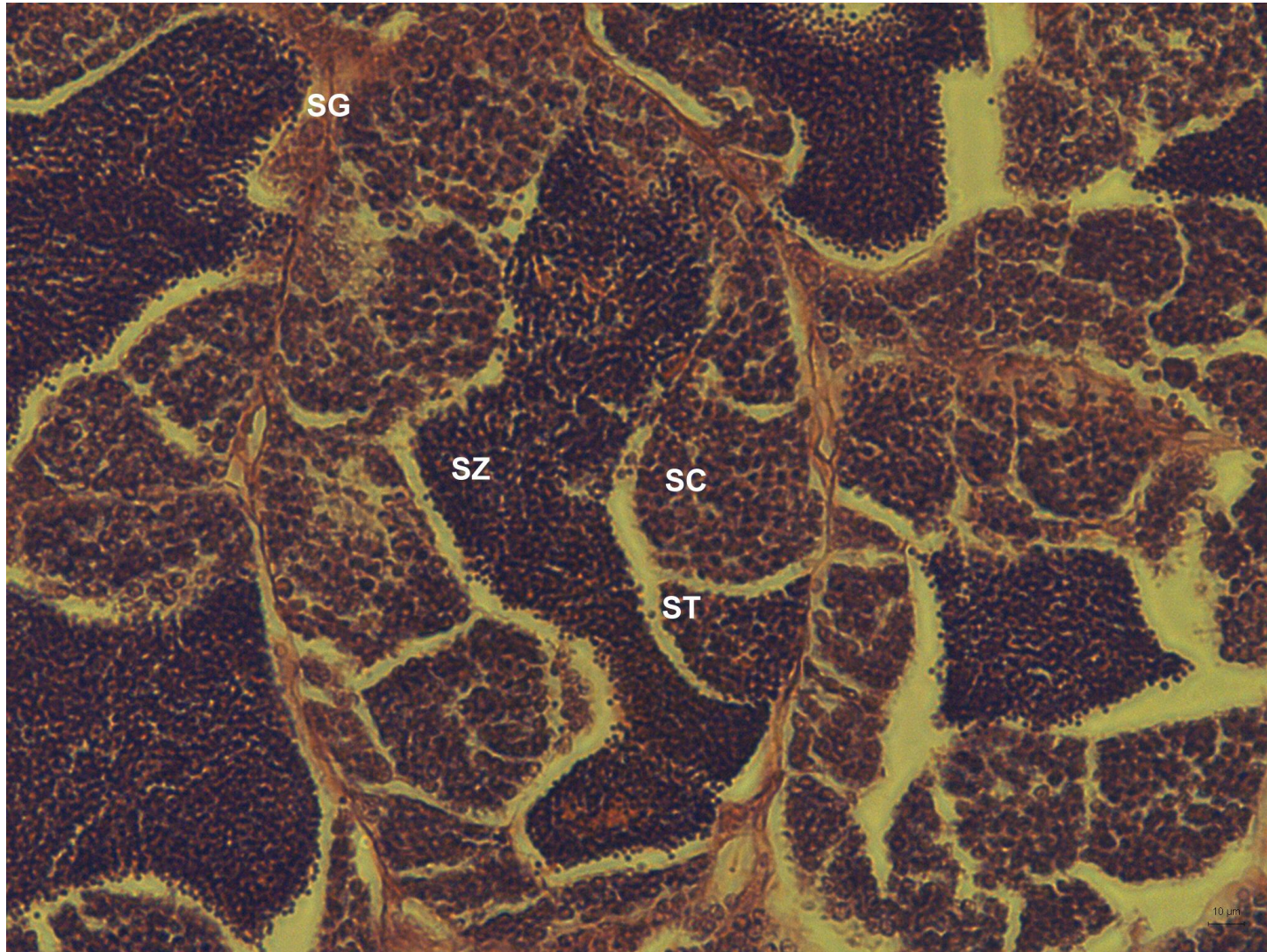
Spermiunfejlődés, here

- A here a csontoshalaknál páros szerv, általában lebenyes felépítésű. A lebenykék felszínén ülnek a Sertoli-féle dajkasejtek, ezek közé beágyazva fejlődnek a spermiumok.
- Egy-egy fejlődésnek induló ősi hs-ből kialakuló utódsejtek és a Sertoli féle sejtek együtt cisztákat alkotnak. Felnyílnak ha érett sperma van bennük.

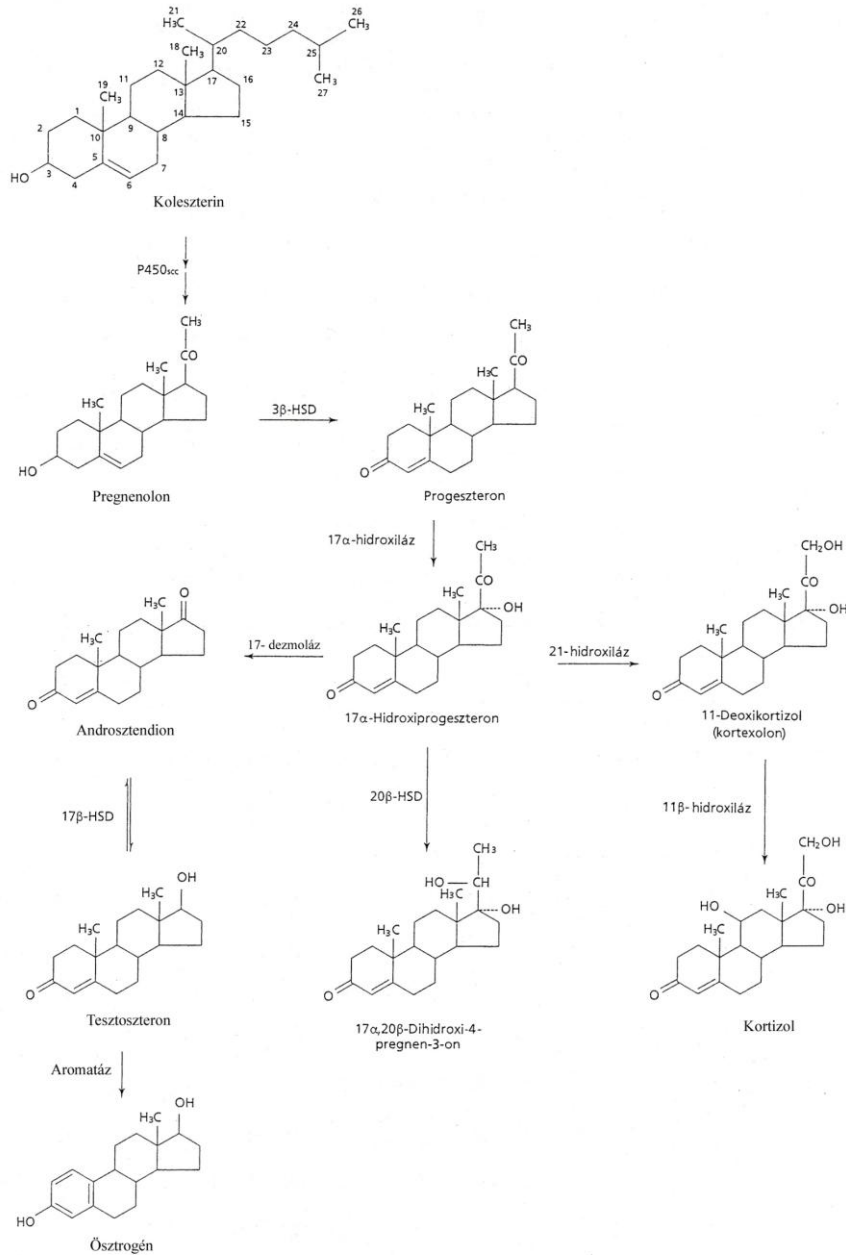


- Gömbölyű fej, elliptikus sejtmag
- Fej és farok között centriólum
- 2-10 darab mitokondrium
- Farok (flagellum)

- A típusú spermatogóniumok. Nagy méretűek, mindig egyesével állnak,
- B típusú spermatogónium, csoportokba rendeződnek, kisebbek
- Elsőrendű spermocita, még $2n$ -es, a cisztákban szinkronizáltan fejlődnek
- Másodrendű spermatocita--- osztódás--- haploid gömbölyű spermida sejtek--- érés után sperma



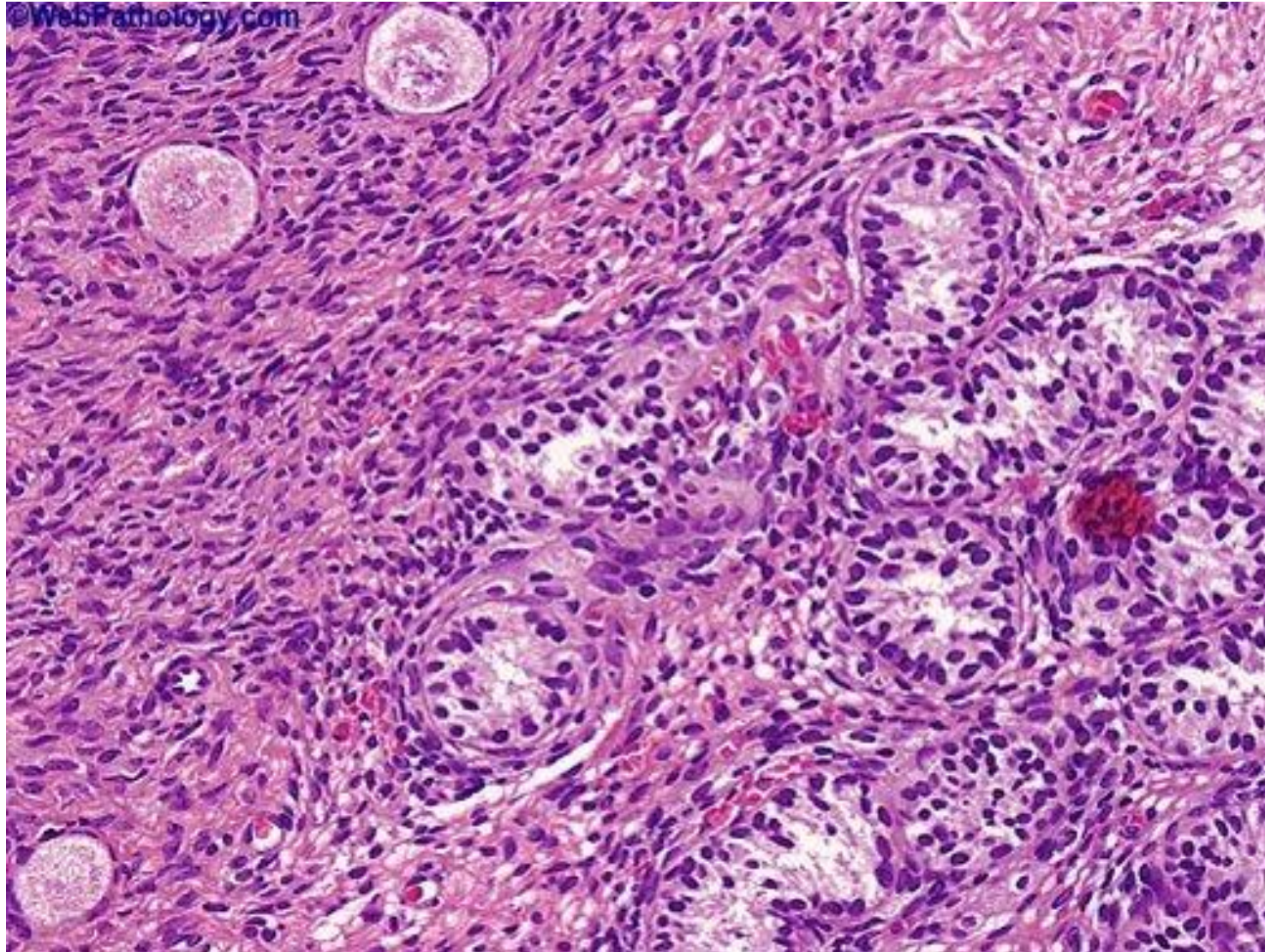
Hormonális szabályozás



- Tesztoszteron!
- Ösztrogén!
(hőmérséklet is befolyásolja a halaknál, ivararány eltolódás)

- Elisa teszt
- RIA teszt
- Fotometriásan

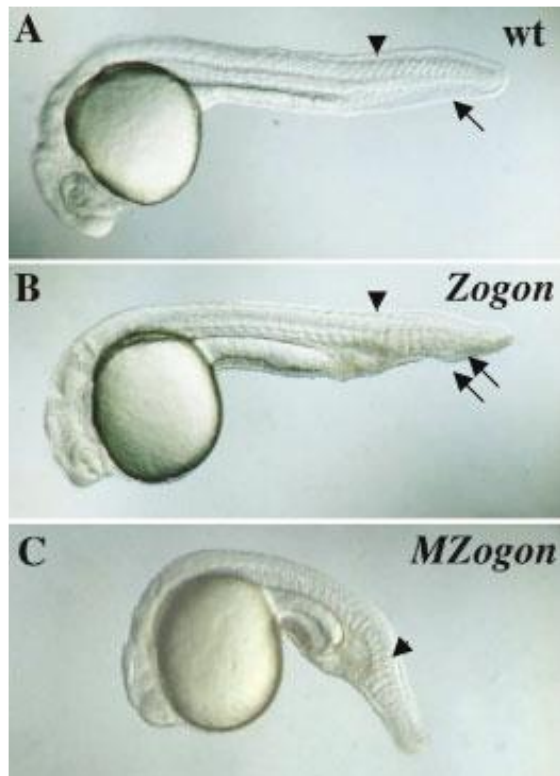
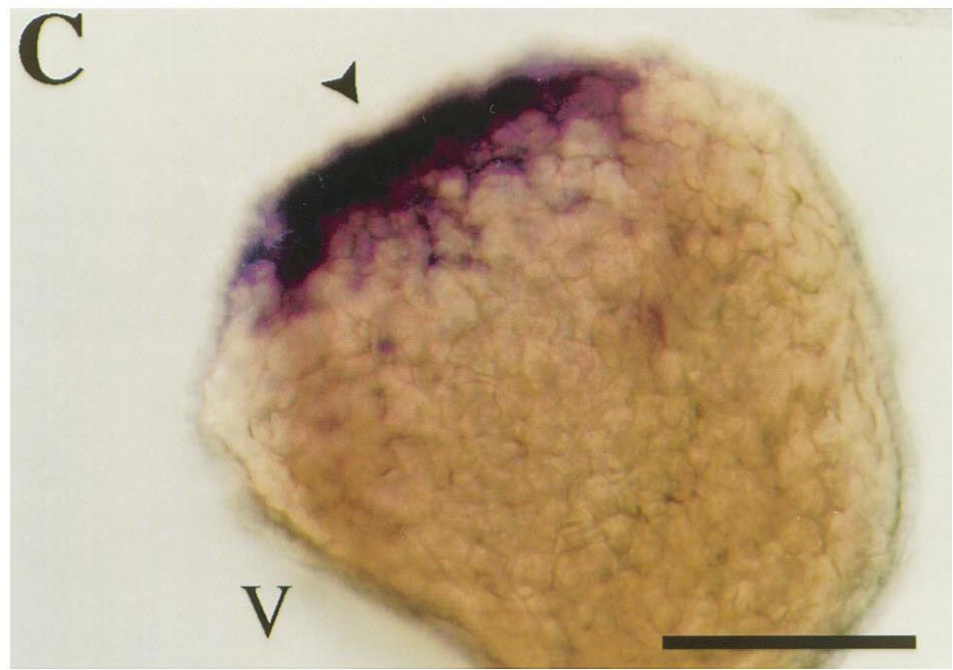
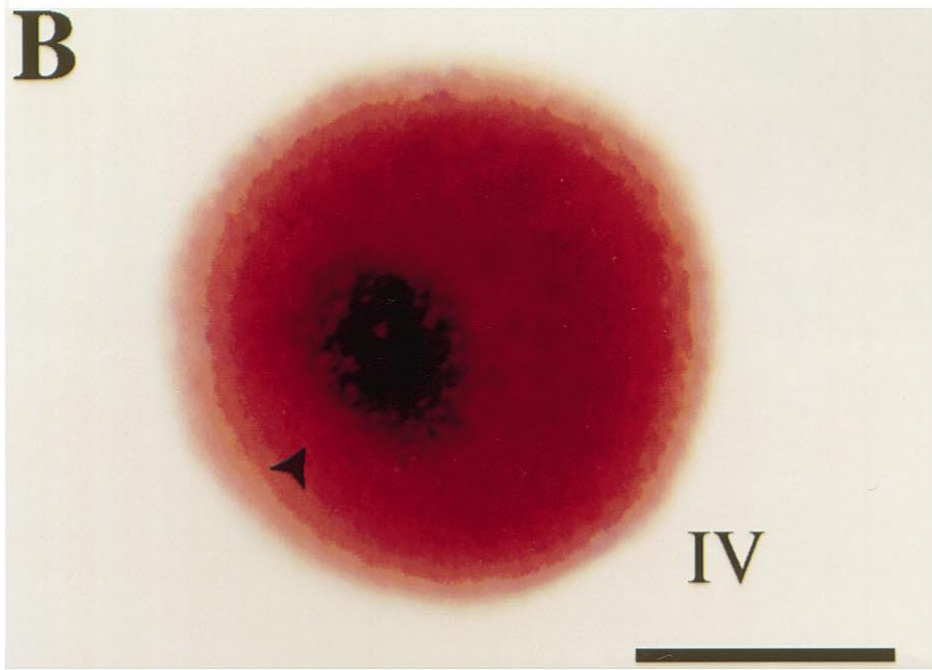
Ovotestis



Ösztrogén(hatású anyagok) magas koncentrációja okozhat ilyen jellegű elváltozást

Anyai hatás biológiája

- A legtöbb állatfajnál, közvetlenül a termékenyülés után, az embrió genomjáról nincs aktív transzkripció az egyedfejlődés korai szakaszában. Ebben a korai időszakban az embrió fejlődését az anyából származó anyagok (a petesejtben jelenlévő RNS-ek, fehérjék, és mitokondriumok) szabályozzák, melyek az oogenezis során szintetizálódnak és halmozódnak fel a petesejtben.
- Ezt a korai szakaszt követi a midblasztula átmenet (MBT), amit a hosszabb, nem szinkronizált sejtosztódási ciklusok, és a transzkripció kezdete jellemeznek, ez az időpont egybeesik a gasztruláció kezdetével. Az MBT-t egy bizonyos sejtmag-citoplazma arány indítja be (nucleocytoplasmic ratio), haploid embrióknál később, tertaploidoknál hamarabb kezdődik.
- Csontoshalaknál általában az első hét osztódás történik szinkronizáltan. A hetedik osztódást követően történik az MBT, ami fajoként valamelyest eltérhet. Zebradánióban a midblasztula átmenet a tizedik osztódást követően történik meg

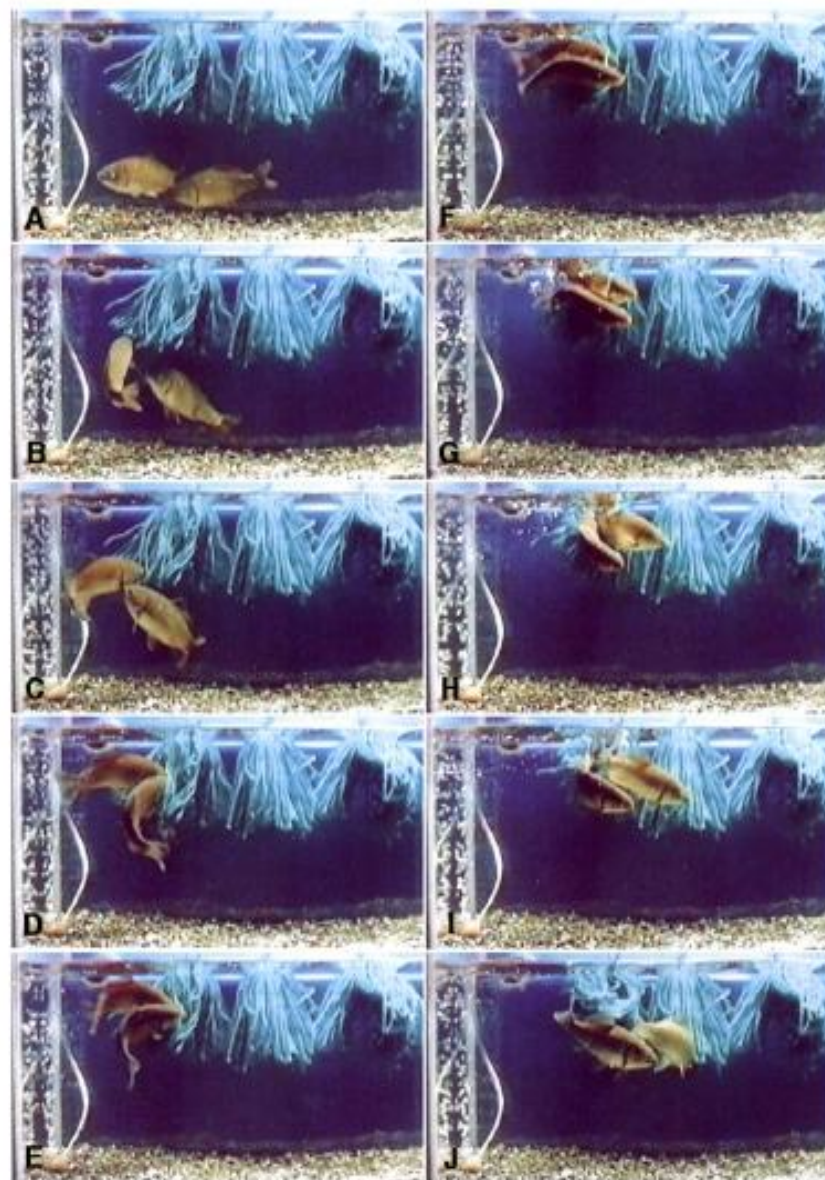
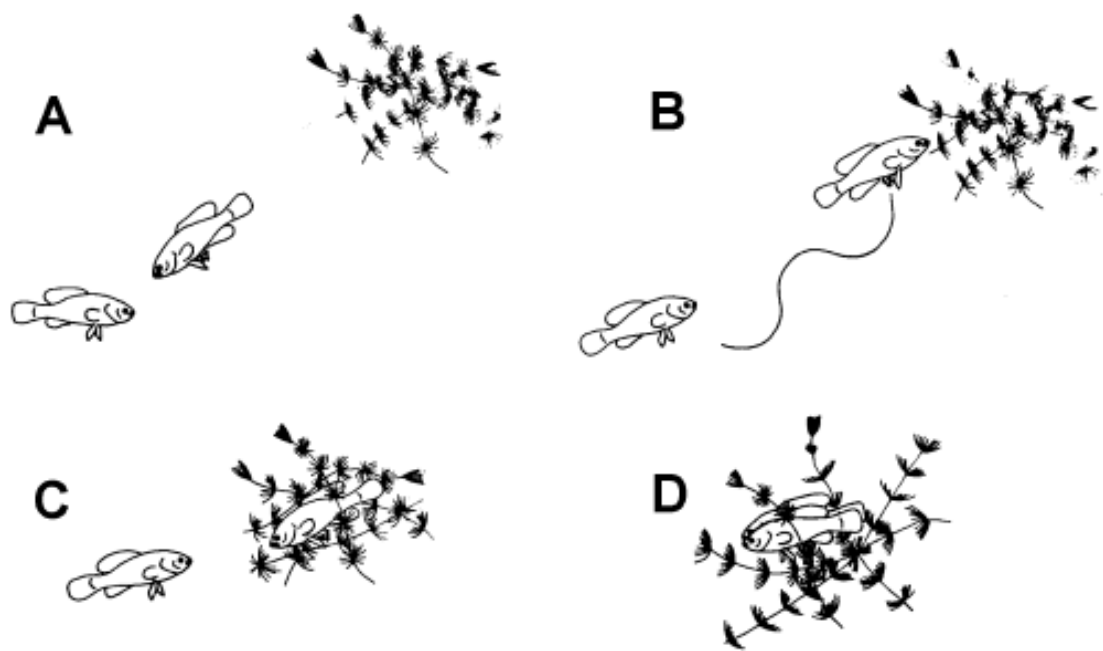


Toxikológiai tesztekben felhasználható mutatók (összefoglalás)

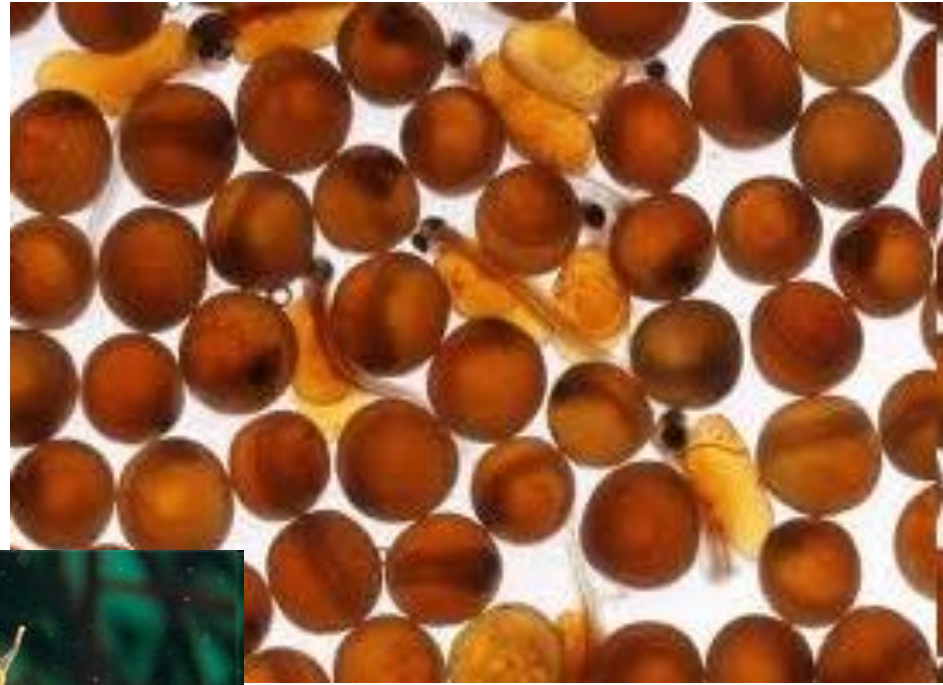
- GSI (gonadoszomatikus index)
- Fekunditás (ikra/anya)
- Ivarsejt fejlődési ütem
- Ivaréréshez szükség idő
- Másodlagos nemi jelleg
- Ivararány (populáció)
- Termékenyülés
- Ivás közbeni viselkedés
- Szövetteni vizsgálatok
- Hormonszint mérés
- Stb...

Az ívást kiváltó tényezők, ívási viselkedés

- Két ivar jelenléte
- Külső és belső optimális vagy közel optimális környezeti tényezők jelenléte
- Ívás meghatározott viselkedésmintázat szerint, fajoként különbözik, de tartalmazhat hasonló elemeket



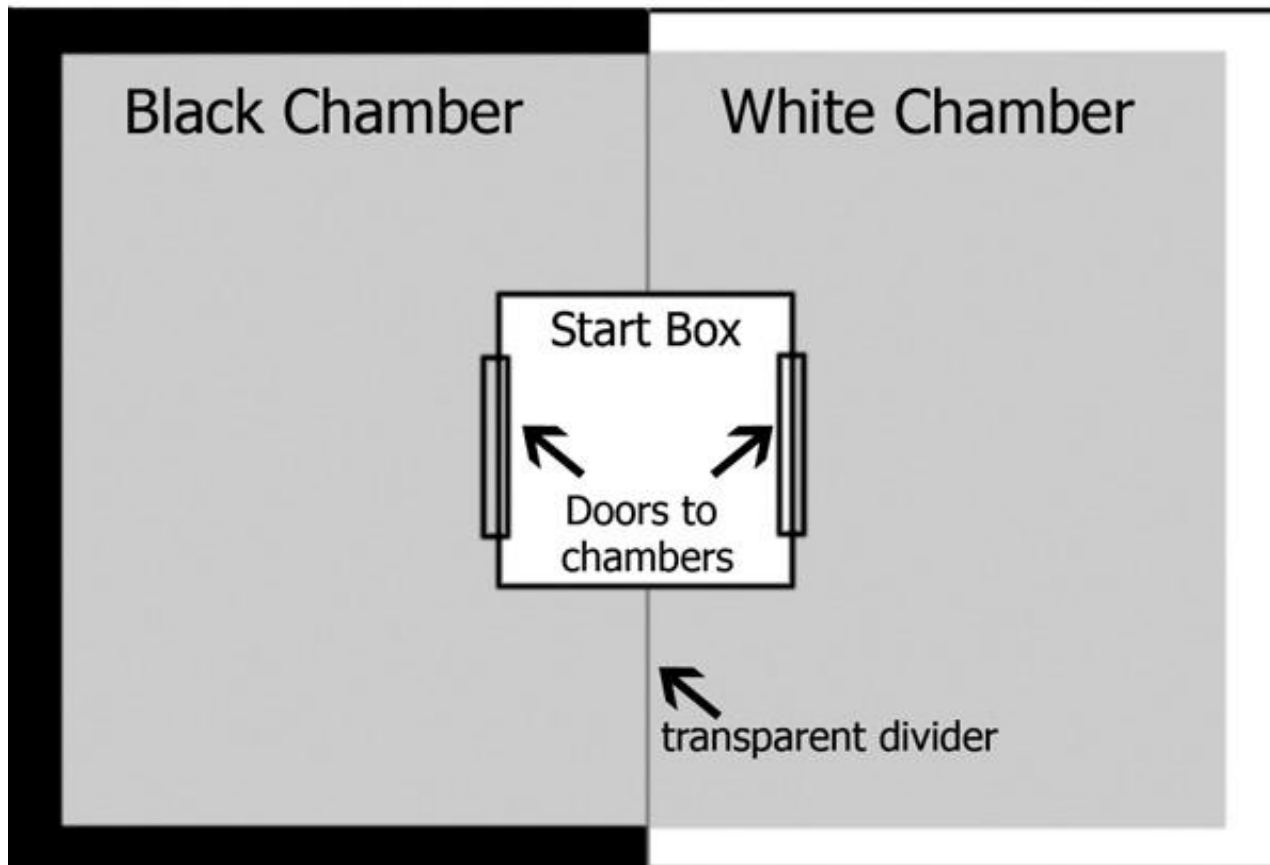
Ivadékgondozás



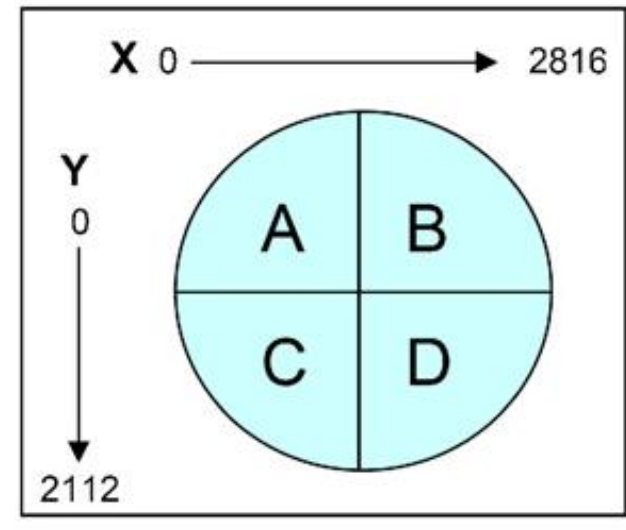
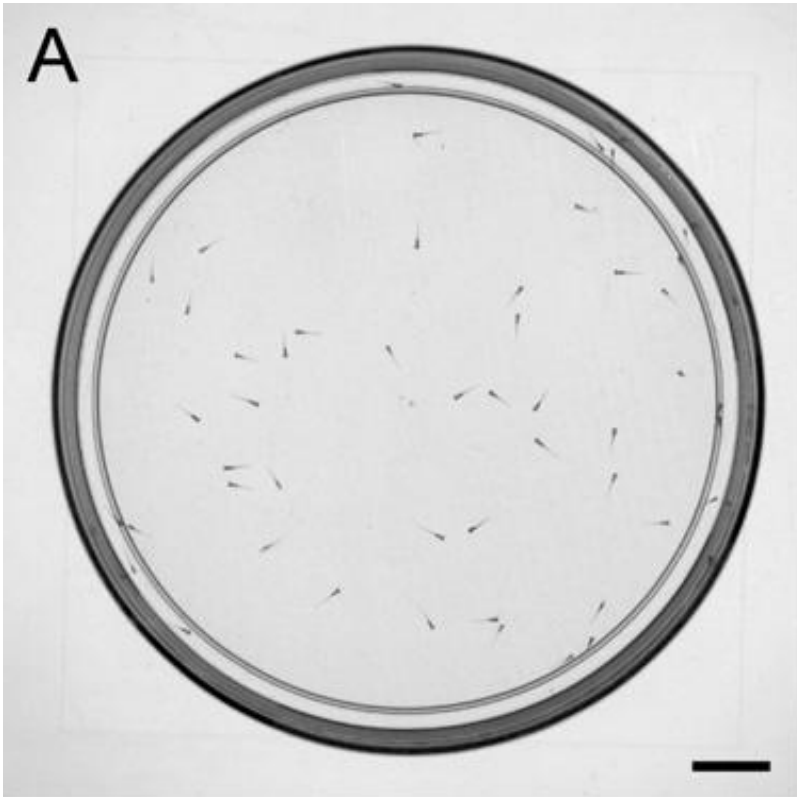
Területhasználat, preferencia

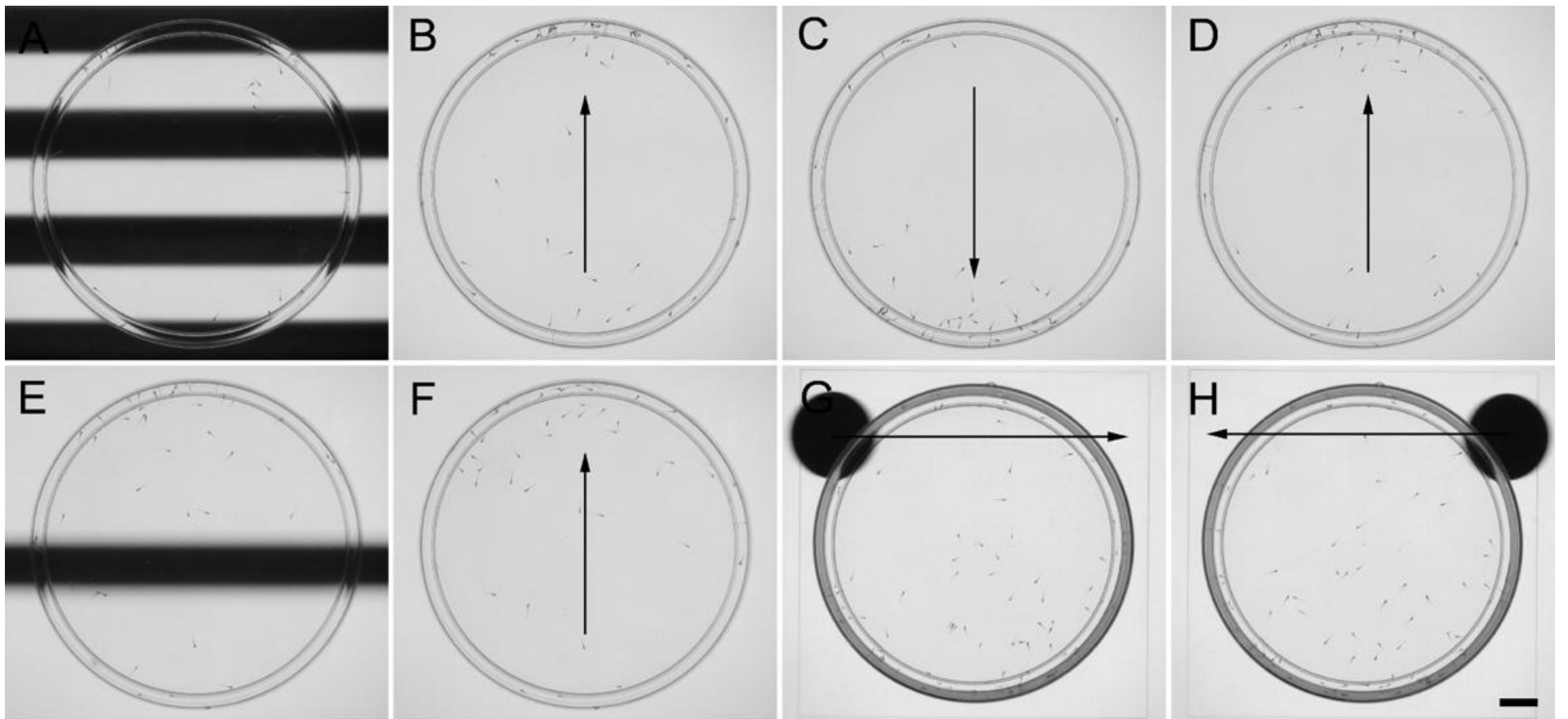
- Felnőtt halakhoz használatos kísérleti medence

Top View of Preference Tank

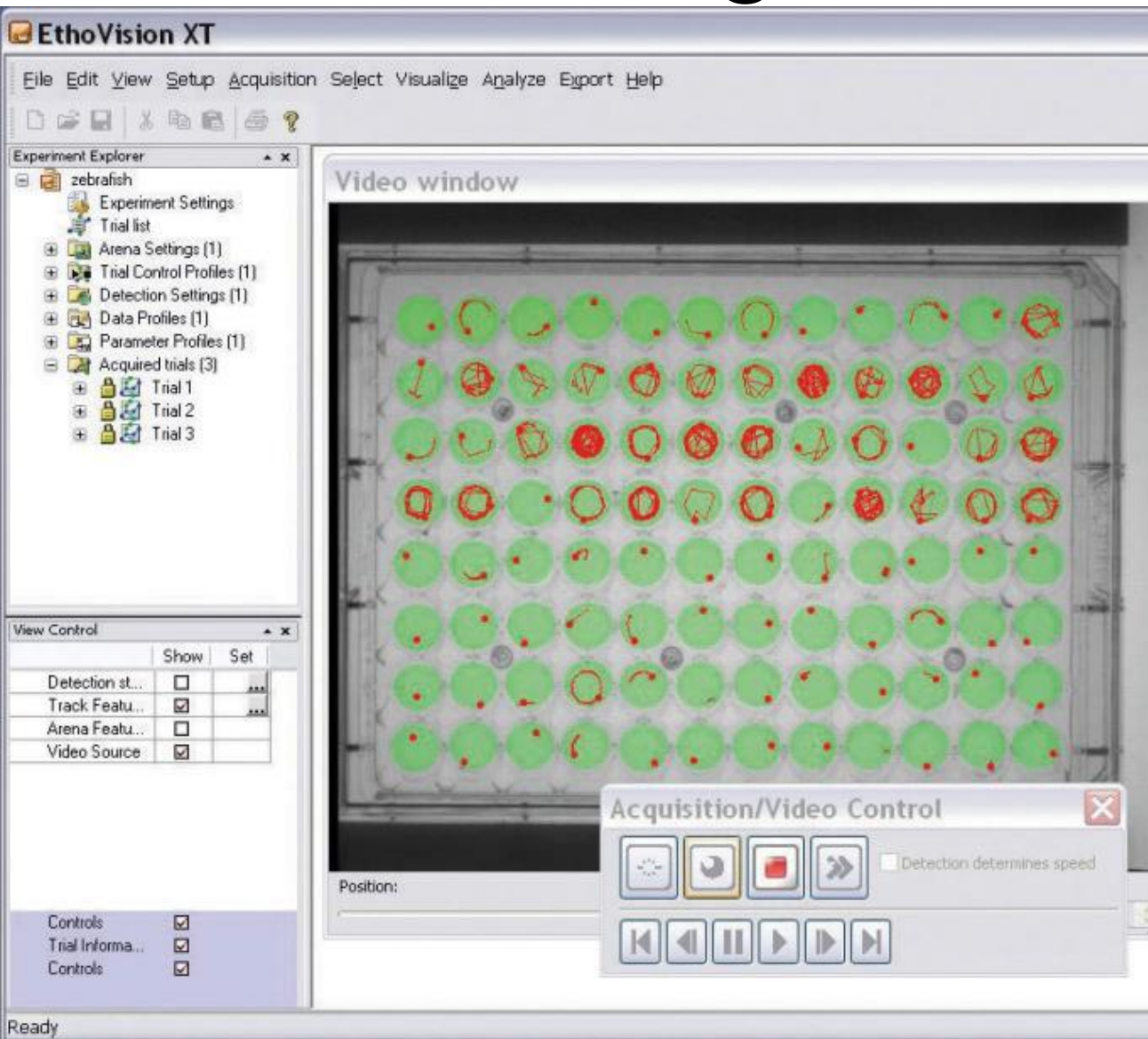


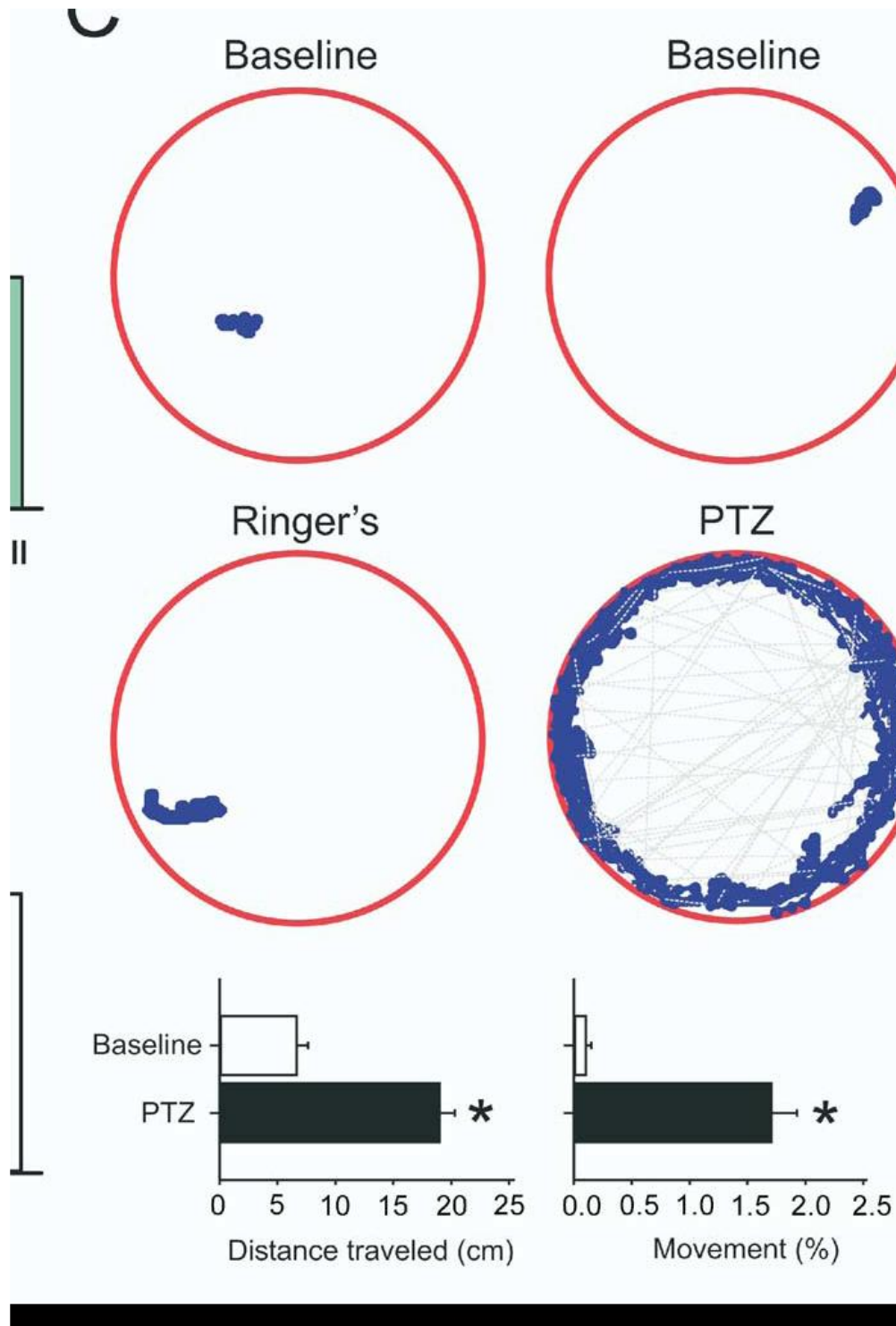
Embriók





Mozgásintenzitás





Speciális életfolyamatokhoz kötött viselkedésformák

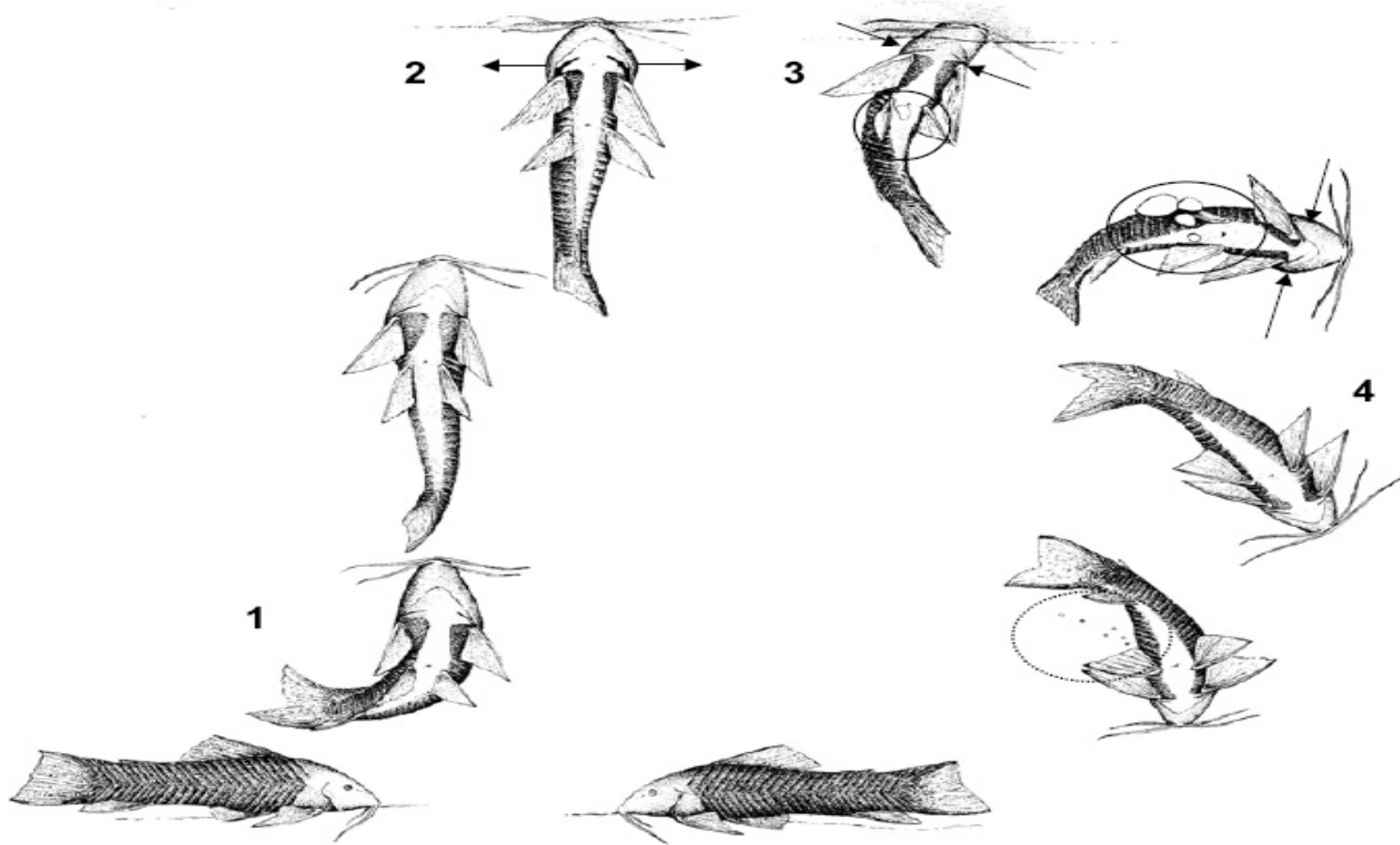


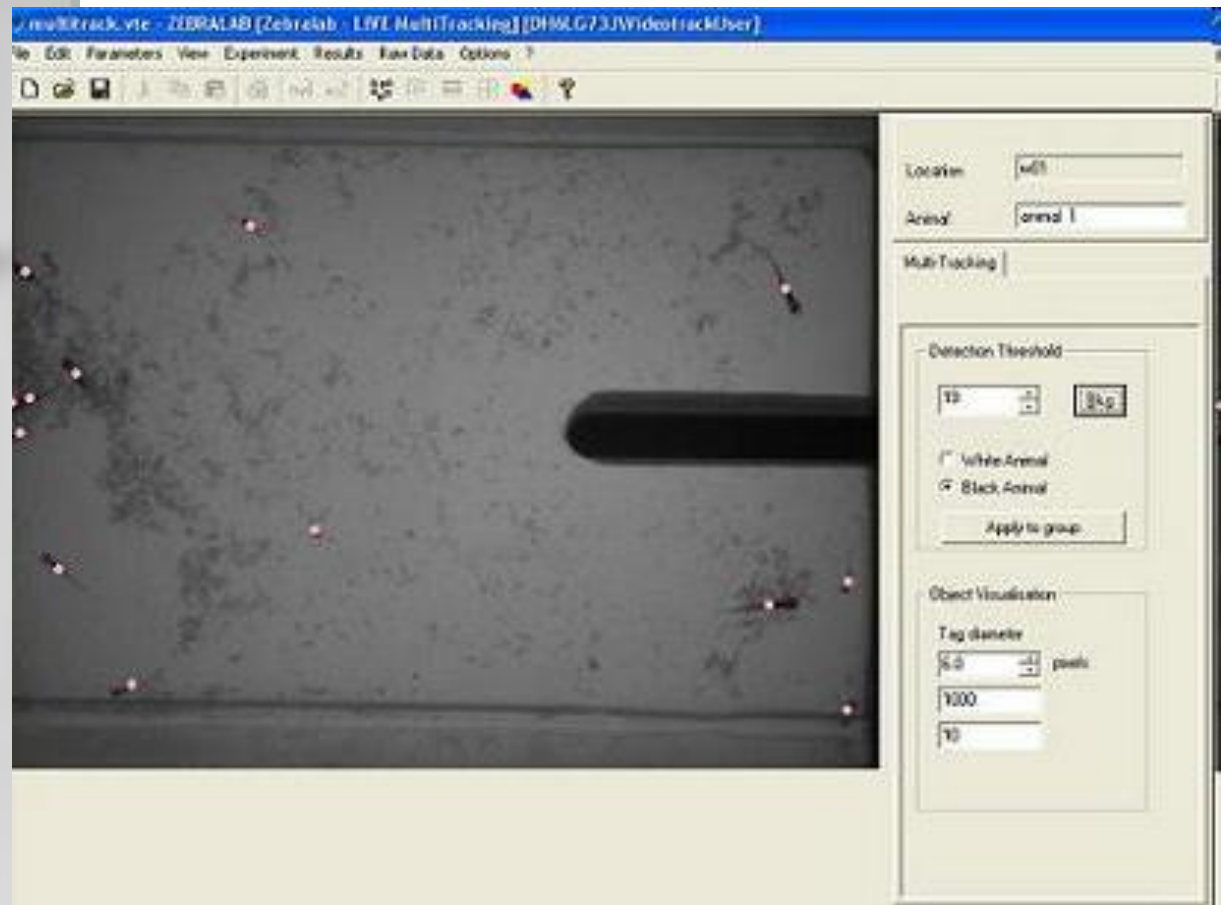
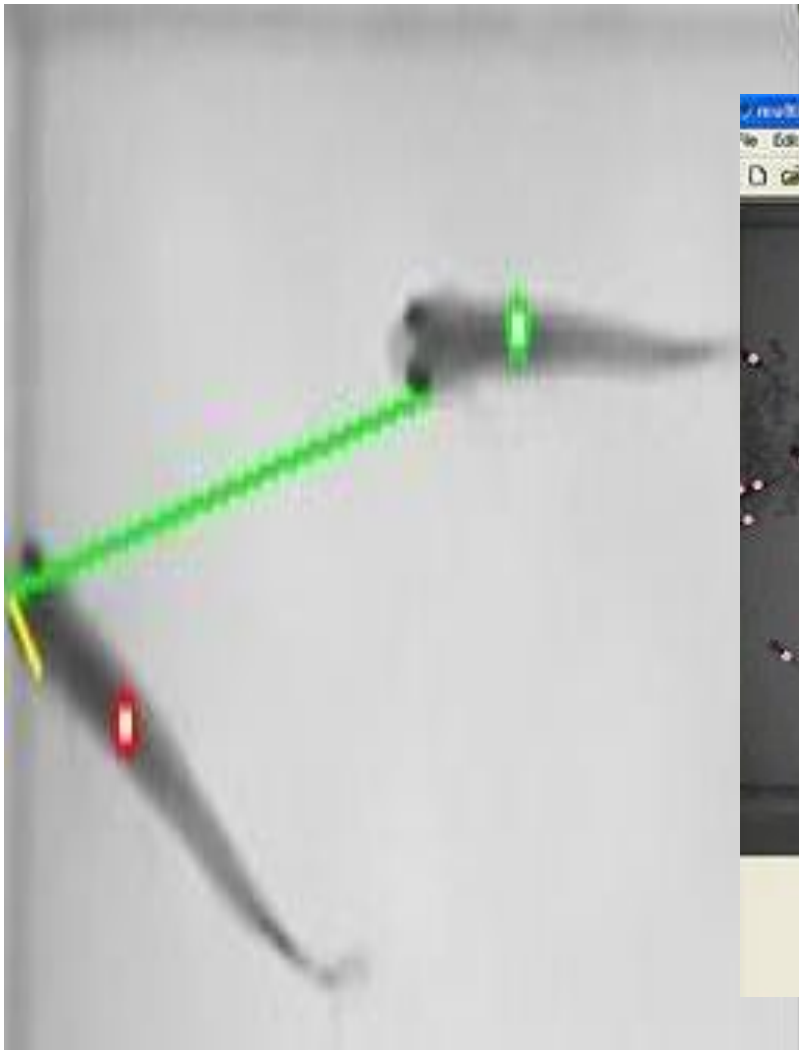
Fig. 1. Air-breathing cycle of *Hoplosternum littorale*: 1) ascent to the water surface; 2) in contact with the surface the fish expands its oral cavity, inspiring air; 3) turning head down, with compression of the oral cavity pushing air into the intestine and causing the expiration of old air from the anus (circle, continuous line); 4) return to bottom and release of small air bubbles through the opercula (circle, dotted line). Arrows indicate the action of the buccal pump.

Csoportos viselkedés

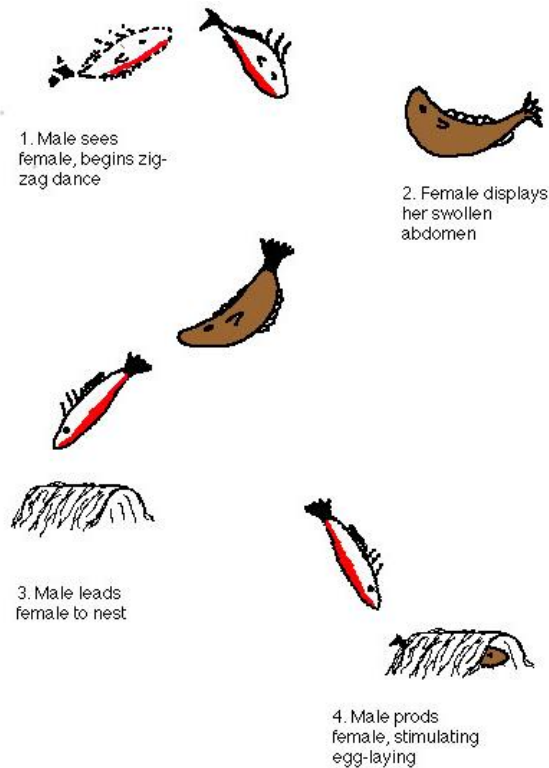
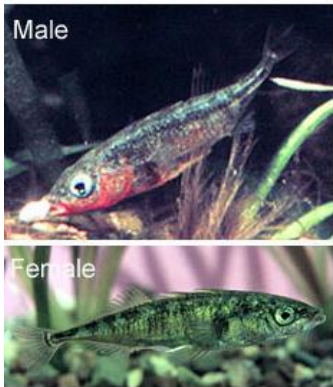
- Ideiglenes (pl táplálkozáskor) vagy zárt társulások (pl bölcsőszájú halak ivadékgyondozás)
- Vizuális és kémiai ingerek





Szociális rangsor



Territoriális viselkedés

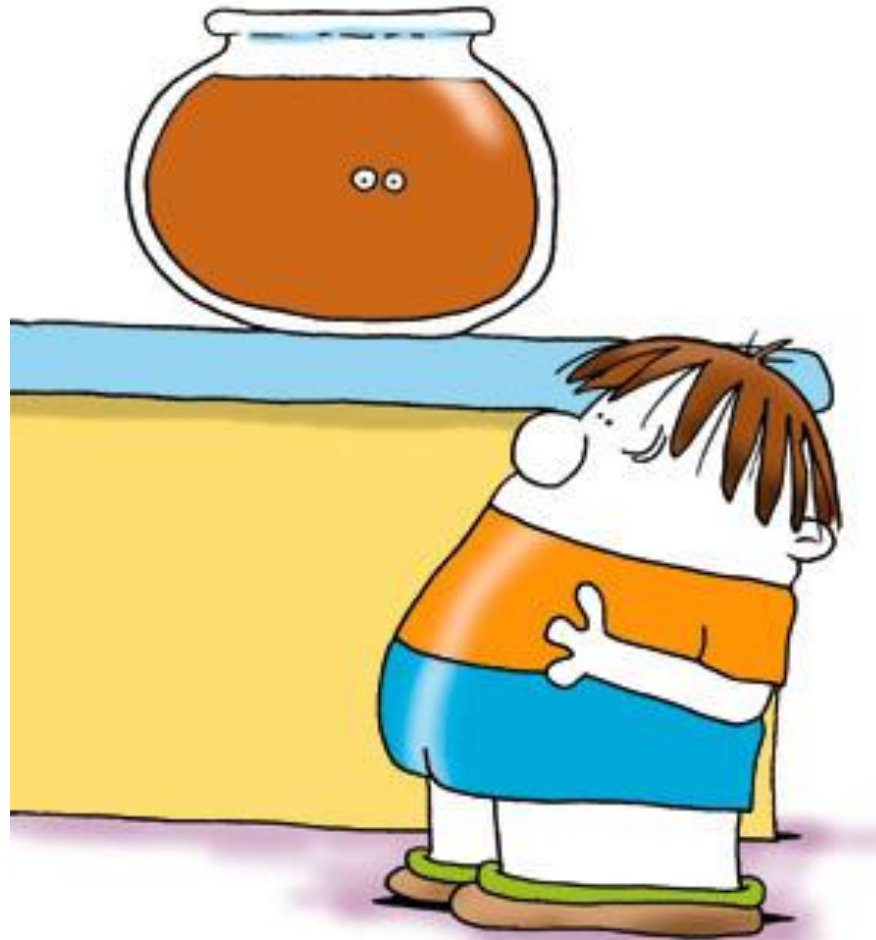


Actual colour & shape	Male stickleback: red belly, bluish-white back	Female stickleback: greyish-green body, swollen silvery belly
Model characteristics	Red belly 	Swollen belly 
Reaction of males to model	Attack	Court

Menekülés, védekezés



Betegséggel kapcsolatos viselkedésformák



Petike aranyhalának már megint hasmenése van...

Tanulás



Egyszerű

- fajtárs- ragadozó
- veszélyhelyzetek
- Csalik
- Etető használata
- (ember jelenléte...)

-DE...

A vizuális vizsgálatok szerepe a halembrió toxikológiában

Csenki-Bakos Zsolt

Az előző részek tartalmából:

- A víz, mint élettér és tesztközeg (fizikai, kémiai, toxikológiai/ökotoxikológiai stb. sajátosságok)
- Toxikológiai alapfogalmak (hidrotox.)
- A legfontosabb vízi tesztorganizmusok áttekintése/ laboratóriumi tartásuk
- Szabványosított toxikológiai vizsgálatok felépítése általánosságban, „vizes expozíció” sajátosságai
- OECD 203; akut halteszt (AFT) (hogyan fogjunk hozzá, mortalitás, mint vizsgálati végpont)
- **Ma pedig elsősorban halembriókkal fogunk foglalkozni...**

Gerinces állatmodellek a laborban

Felhasználás szerinti megoszlás: 80% egér/patkány; 10% zebradánió; 10%-egyéb (kutya, tm, nyúl, béka stb...)



Gerinces állatmodellek a laborban

Felhasználás szerinti megoszlás: 80% egér/patkány; 10% zebradánió; 10%-egyéb (kutya, tm, nyúl, béka stb...)



90% embrió/lárva



Hogyan „úszott a képbe” a zebradánió embrió?

- Emlős modellek (egér, patkány, nyúl stb.)
- 3R stratégia elterjedése
- Szigorodó állatvédelmi törvények
- High-throughput stratégiák alkalmazása
- Szükség volt és van alternatív modellekre

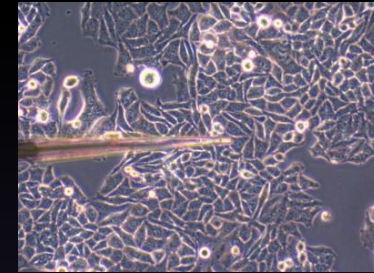


Alternatív modellek

In silico modellezés



Sejt- és
szövettenyészetek



C. elegans

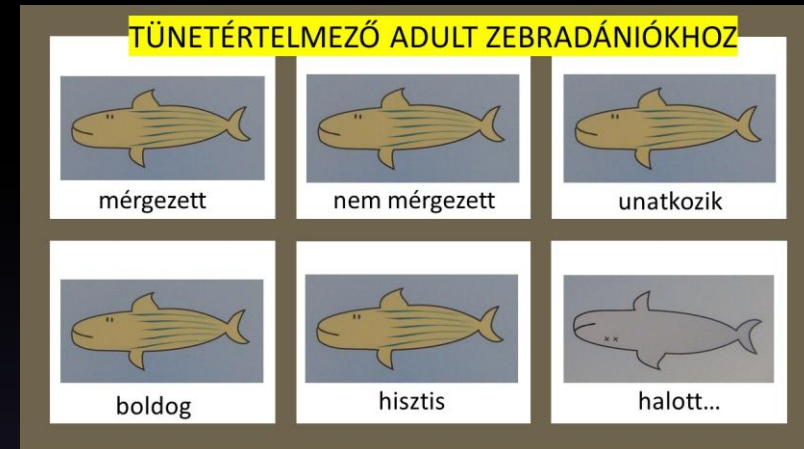


Halembriók
(zd.)

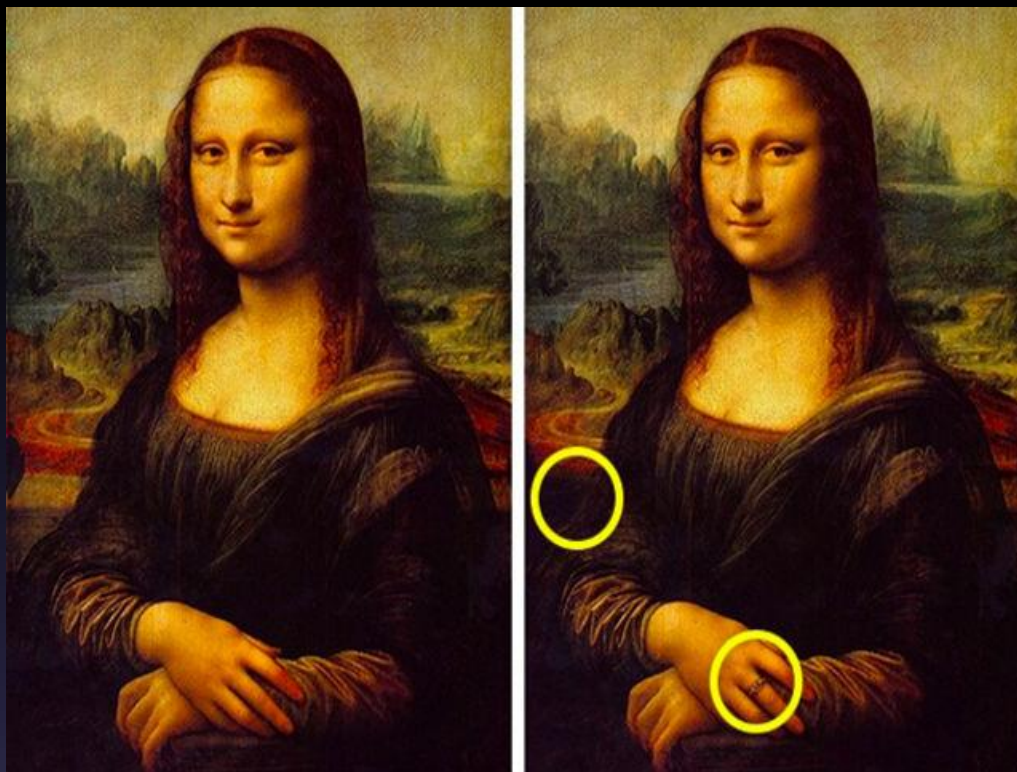


Fenotípusos elváltozások keresésének lehetőségei zebradánión

- A hal „tünetszegény” modell.
- Adult halak esetében ez általában igaz → szervi elváltozások megfigyelése csak boncolás után (kivéve néhány pigmentmutáns vonal pl.: *Casper*)
- Az embriókban *in vivo* is van lehetőség erre, mert
 - *ex utero* az egyedfejlődésük
 - az ikrahéj átlátszó és nem ragadós
 - az embriók/lárvák teste transzparens



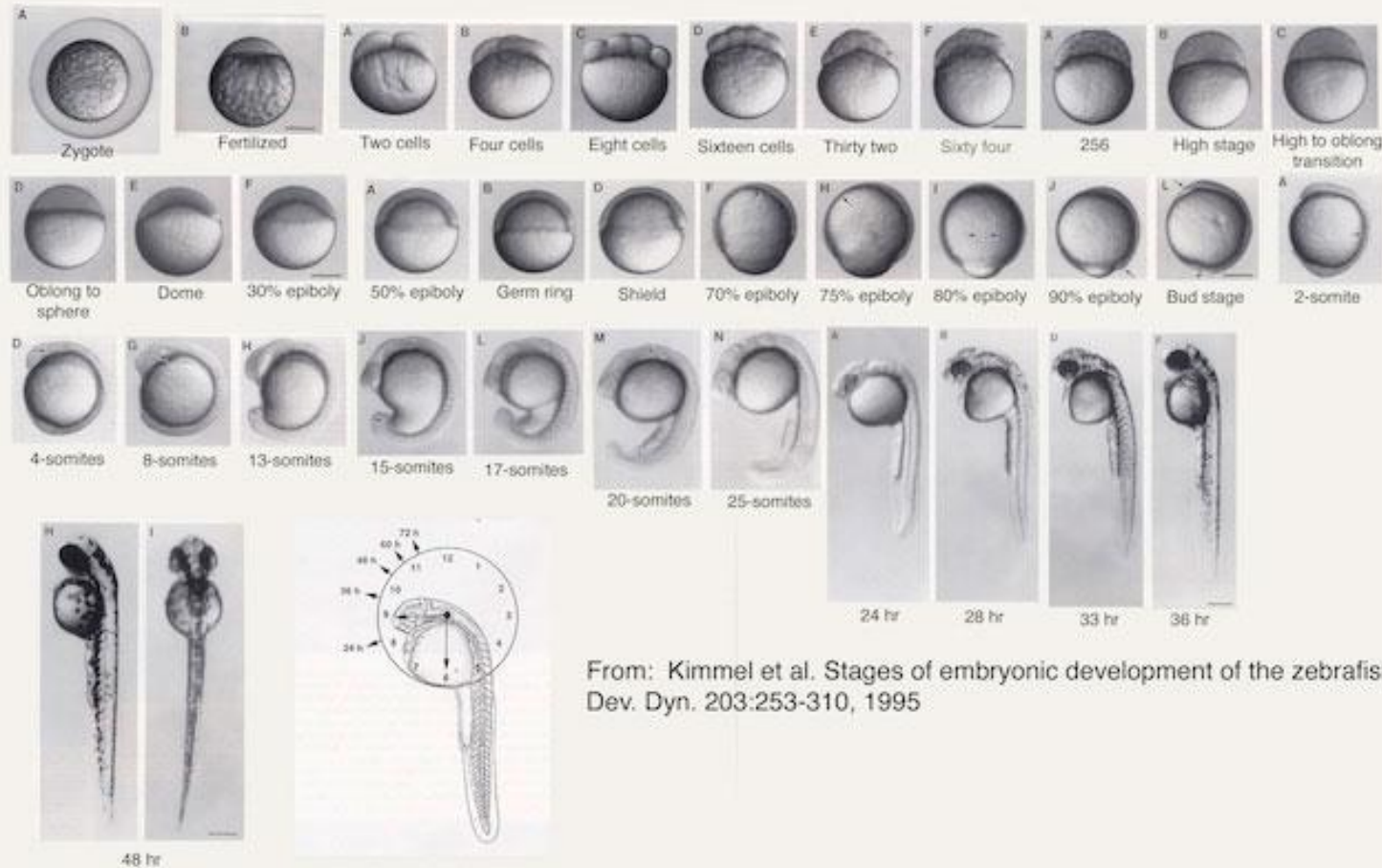
**A fenotípus vizsgálat erre a játékra hasonlít:
Keresd a két különbséget a két kép között...**



cosmopolitan.hu

... a nehezítés csak annyi, hogy senki nem mondja meg előre mennyi különbség lesz.

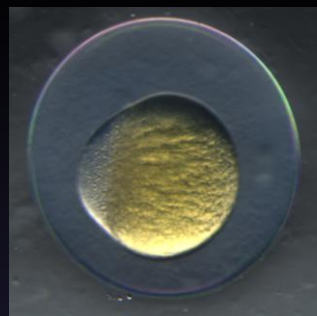
A zebradánió embriók egyedfejlődésének atlasza („a sorvezetőnk”)



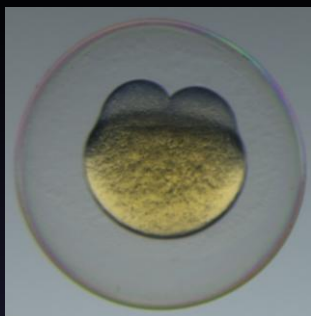
From: Kimmel et al. Stages of embryonic development of the zebrafish
Dev. Dyn. 203:253-310, 1995

Ikra (embrió) válogatás

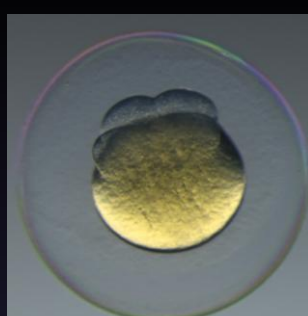
Csontoshalaknál általában az első 7 osztódás szinkronizáltan zajlik a termékenyülés után (zd: első 10 osztódás) → a sejtek egyforma méretűek (és az előző osztódáshoz képest kb. feleakkorák). Ez a támpont a válogatásban. (osztódások 20-25 percenként 25,5 °C-on (zd.))



Termékenyült ikra
(1 sejt)



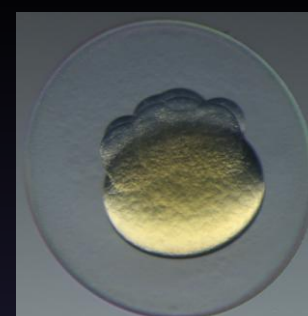
2 sejtés állapot



4 sejtés állapot



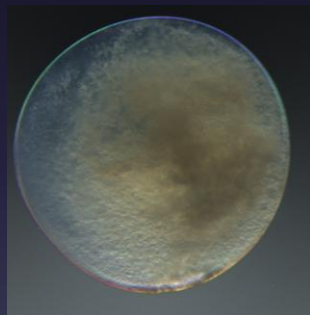
8 sejtés állapot



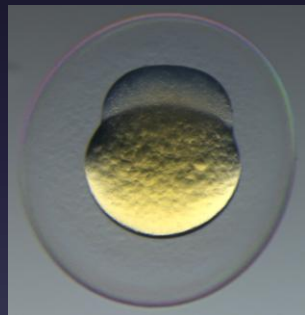
16 sejtés állapot



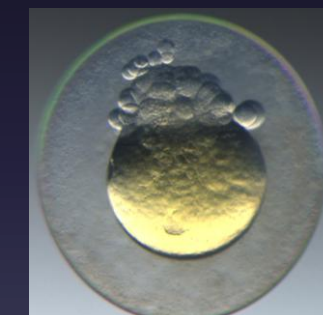
32 sejtés állapot



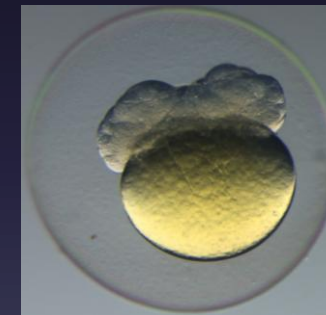
Koagulált ikra



Nem termékenyült ikra



Hibás sejtosztódások



Vad típusú (AB) zebradániók egyedfejlődése az első négy napban

24 órával a termékenyülés után (ikrahéjban/dekorionálva)



72 órával a termékenyülés után (kelés)



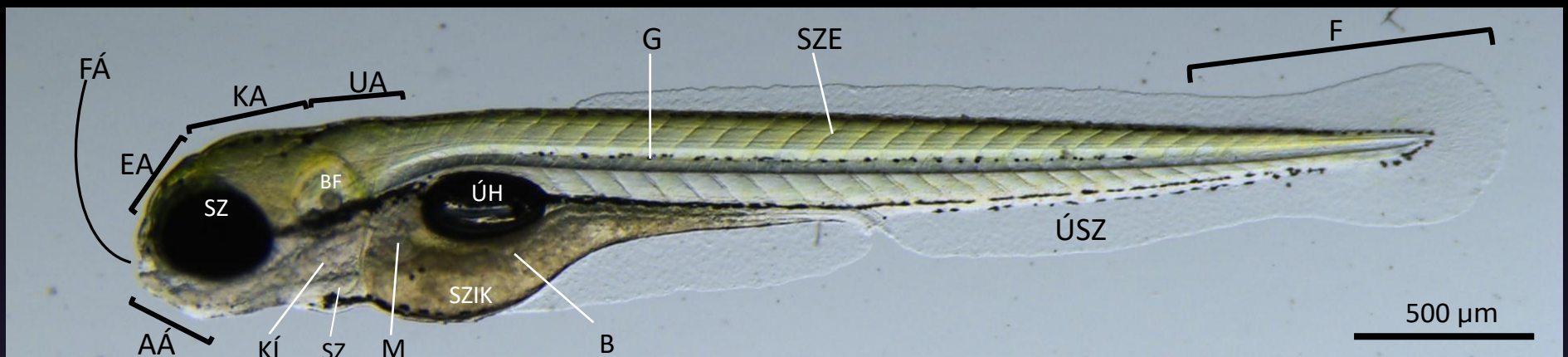
48 órával a termékenyülés után (ikrahéjban/dekorionálva)



96 órával a termékenyülés után



5 napos normál fejlődésű, vad típusú (AB) zebradánió



Rövidítések:

Felső sor: FÁ: felső álkapocs; EA: előagy, KA: középagy; UA: utóagy, G: gerinchúr; SZE: szelvények; F. farok

Középen: SZ: szem; BF: belső fül (otolit zsákocská); ÚH: úszóhólyag

Alsó sor: AÁ: alsó álkapocs; KÍ: kopolytú ívek; SZ: szív; M: máj; B: bélcsatorna; ÚSZ: úszószegély

A zebradánió 5 napos (120 órás) kortól képes önálló táplálkozásra, inentől kezdve már vonatkoznak rá az állatvédelmi törvények!

(fenotípusa: a száj már kinyílt, illetve megfigyelhető az úszóhólyag)

OECD No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test (2013)

Cél: Egy vegyi anyag LC50 értékeinek meghatározása 96 órás expozíció alatt (naponta)

Beállítás: 5 koncentráció + kontrollok, +kontroll: 4 mg/l 3,4-dichloroaniline (határérték kereső teszt; limit teszt (100mg/l))

Egyedszám: 20 embrió/konc., egyedileg elhelyezve

Végpont: Pusztulás, amit vizuális vizsgálattal határozunk meg, egyéb fenotípusos elváltozások meghatározása nem kötelező.

Validitás: mint az AFT-nél + pozitív kontrollnál min. 30% pusztulás (96h)

Az embrió akkor tekinthető pusztultnak, ha az alábbi kritériumokból legalább egy teljesül:

	Expozíciós idő			
	24 óra	48 óra	72 óra	96 óra
Koagulált embrió	+	+	+	+
Szomiták hiánya	+	+	+	+
Farok nem válik el a sziktól	+	+	+	+
Szívverés hiánya		+	+	+



Koagulált embrió



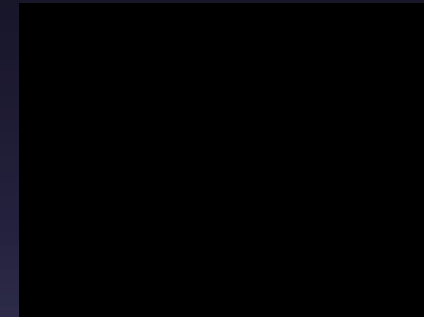
Szomiták hiánya



Farokelválás hiánya



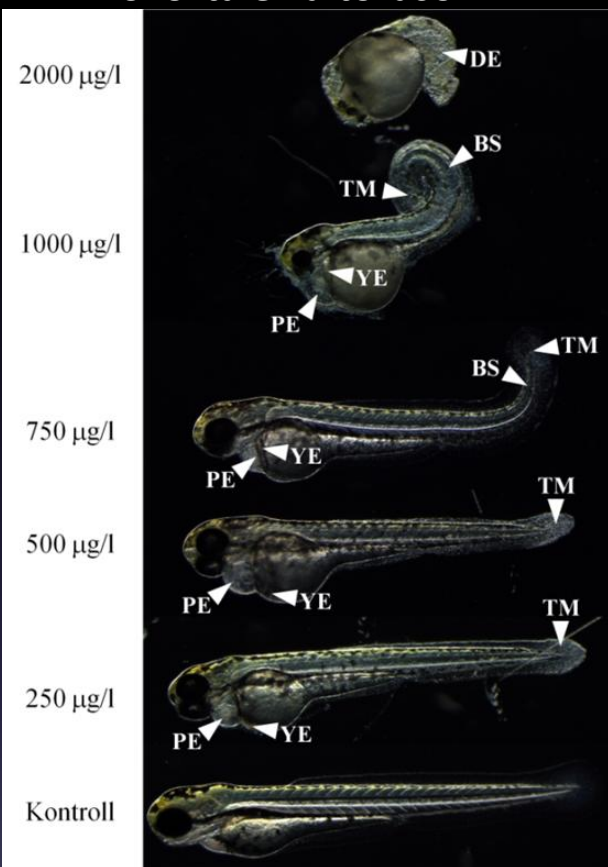
Szívburok ödéma
bakt. fert. is okozhatja



Embrió szívveréssel

A fenotípusos elváltozások értékelése

Zearalenon (mikotoxin) kezelés okozta elváltozások



A fenotípusosan megjelenő tünetek a vizsgált anyag hatásainak pontosabb megismerését, felmérését teszik lehetővé.

A fenotípusos vizsgálatot (tünetelést) ugyanúgy kell végezni, mint ahogy a letalitást vizsgáljuk. Minden koncentráció, minden ismétlésének, minden egyedét megvizsgáljuk egymás után (a kontrollal kezdve) és minden észrevett tünetet lejegyzünk.

Az egyes tünetekre/tünetcsoportokra (vizsgálati végpont) dózis-hatás elemzéseket csinálhatunk (hasonlóan, mint a pusztulás elemzésénél) és **EC értékeket** számolhatunk rájuk (effective concentratio (hatásos koncentráció)). Azt, hogy egy elváltozás specifikus, vagy nem specifikus az adott tesztanyagra a **Specifitási Ráta** (Specificity ratio – SR) adja meg nekünk.

$$SR = \frac{LC50_{\text{Experimentális}}}{EC50_{\text{Véggpont}}}$$

Ha az $SR \approx 1 \rightarrow$ nem specifikus válasz (overt toxicity-„nyilvánvaló toxicitás”)

Ha az $SR > 2 \rightarrow$ specifikus válasz

- A legtöbb esetben több tünettől is számolhatunk egy embrión.
- Egy tünetegyüttes („fenotípus mintázat”) megfigyelése alkalmas lehet a tesztelt vegyület molekuláris hatásmechanizmusának a felderítésére is (információs forrás pl.: zfin.org).



Research

Genomics

Resources

Community

Support

Sign In

Search expert curated zebrafish data

Phenotype ▾

Search

Fig. 1 of Monroe et al., 2016

Genes

Search for genes, transcripts, clones, and other markers



Expression

Search for gene expression data, and annotated images



About ZFIN

The Zebrafish Information Network (ZFIN) is the database of genetic and genomic data for the zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism. ZFIN provides a wide array of expertly curated, organized and cross-referenced zebrafish research data.

[Learn More](#)

Mutants/Tg

Search for mutants, knockdowns, transgenics, and affected phenotypes



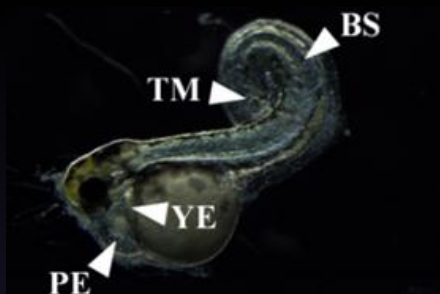
Antibodies

Search for antibodies by gene, labeled anatomy, and other attributes



Your Input Welcome

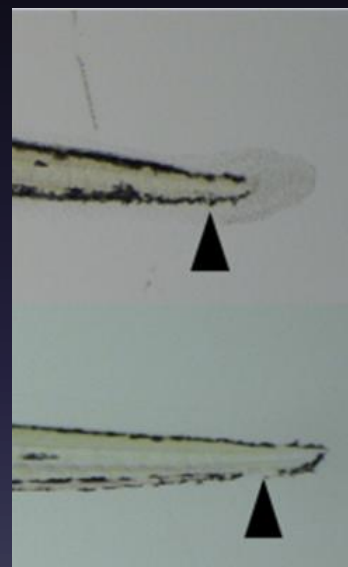
- A legtöbb esetben több tünettel is számolhatunk egy embrión.
- Egy tünetegyüttes megfigyelése alkalmas lehet a tesztelt vegyület molekuláris hatásmechanizmusának a felderítésére is.



„Heart and soul” fenotípus → atipikus protein-kináz C (α PKC) gén működése változik (epitheliális szövetek kialakulása és szervfejlődés)

Nagyon ritkán akár egyetlen elváltozás is utalhat egy vegyületcsoportra:
 Ösztrogénhatású vegyületek hatására gyakran záródik az embrión körbefutó pigmentsáv a farokúszó tövénél. Normál esetben nyitva marad.

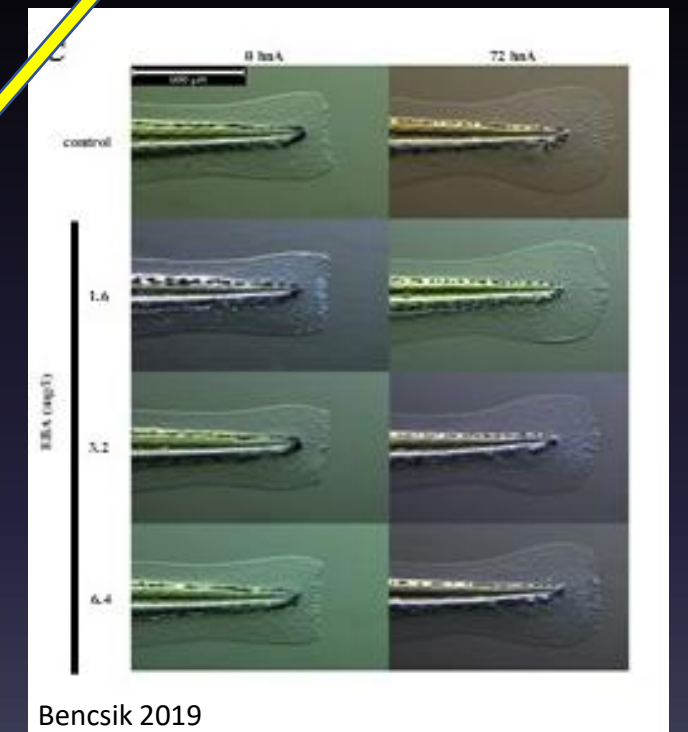
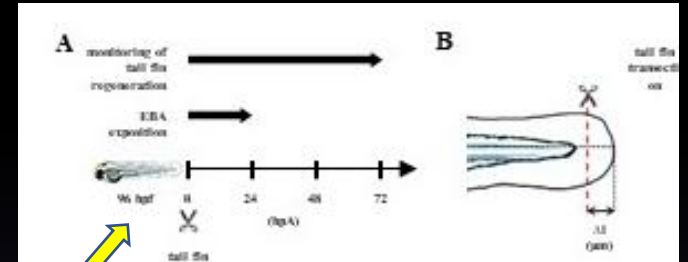
Ajánlott a megfigyeléseinket más módszerekkel is visszaigazolni!



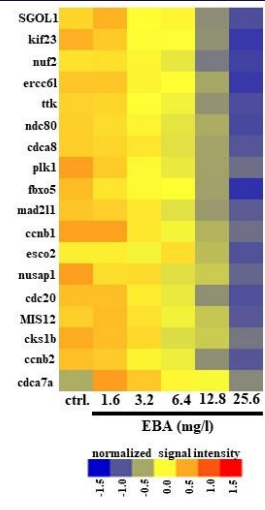
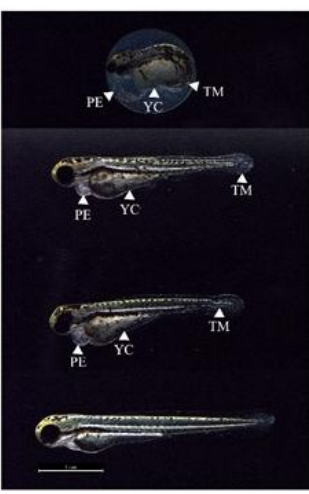
Fordítva is igaz: a génexpressziós változások alátámasztására is alkalmas lehet a fenotípusos vizsgálat

A fenotípusok akár „készíthetőek” is.

(EBA: 4-etil-benzaldehid, az ibuprofen egyik bomlásterméke, ill. mandula aromaként használják)

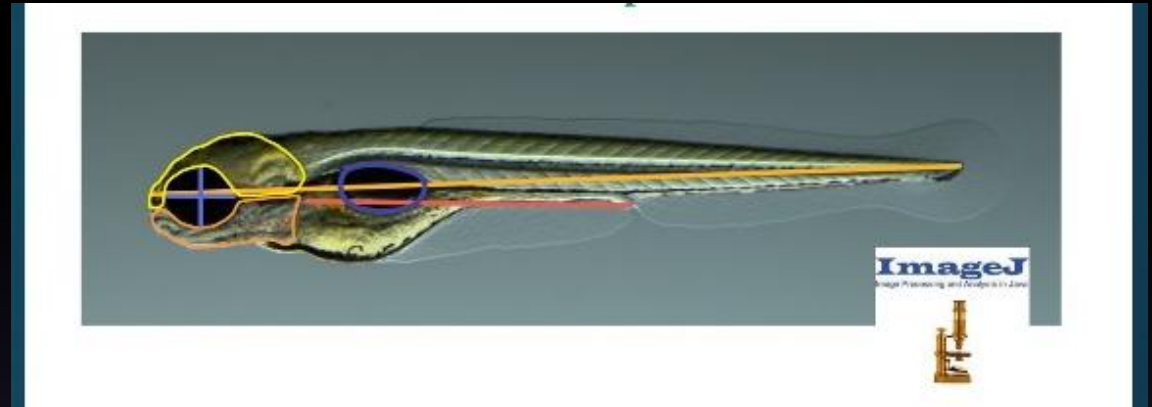


Bencsik 2019



Cluster	Top 5 biological functions	p-value
Cluster 1	response to light stimulus	1,38E-06
	response to radiation	4,38E-06
	DNA repair	1,11E-05
	response to DNA damage stimulus	2,07E-05
	cellular response to stress	3,24E-05
Cluster 2	cell division	3,24E-12
	cell cycle	5,14E-10
	M phase	1,37E-07
Cluster 3	cell cycle phase	1,79E-07
	cell cycle process	1,16E-06
	response to bacterium	0,00523
	response to organic substance	0,008128
	immune response	0,014503
	cellular amino acid derivative metabolic process	0,04253
	response to inorganic substance	0,048799

Szoftveres kiértékelés



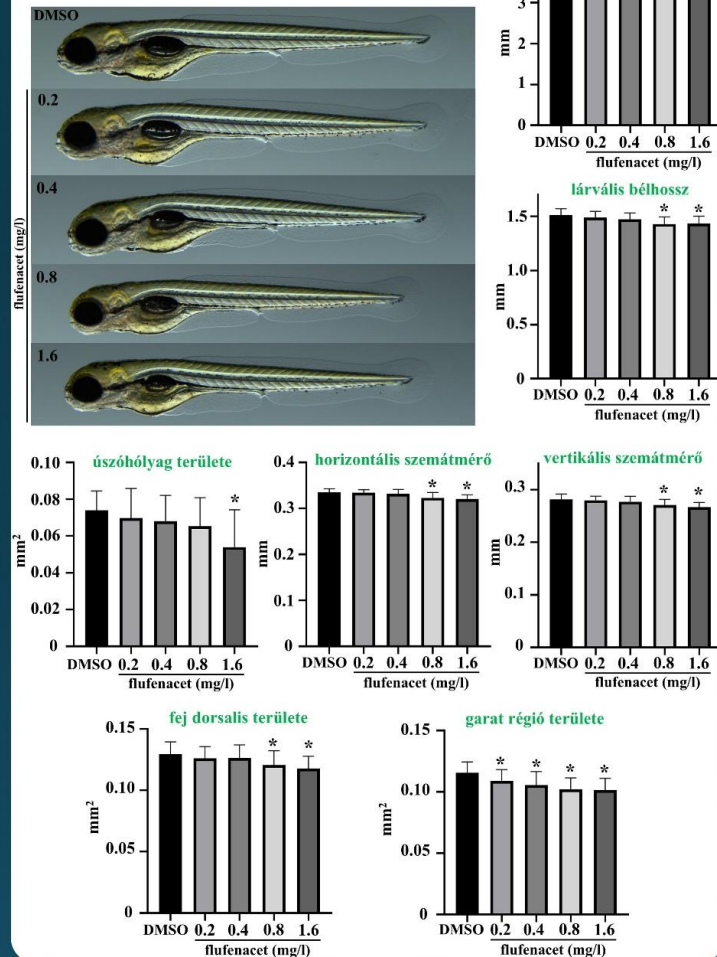
Ivánovics et al 2024.

- Fénykép alapján történő kiértékelést is lehetővé tesz.
- Nagyon pontos kiértékelést tesz lehetővé.
- Nagyrészt kiküszöböli az emberi tényezőből eredő szubjektivitást.
- Nagy a munkaigénye (fényképezés+ kiértékelés).

<https://imagej.net/ij/>

EREDMÉNYEK

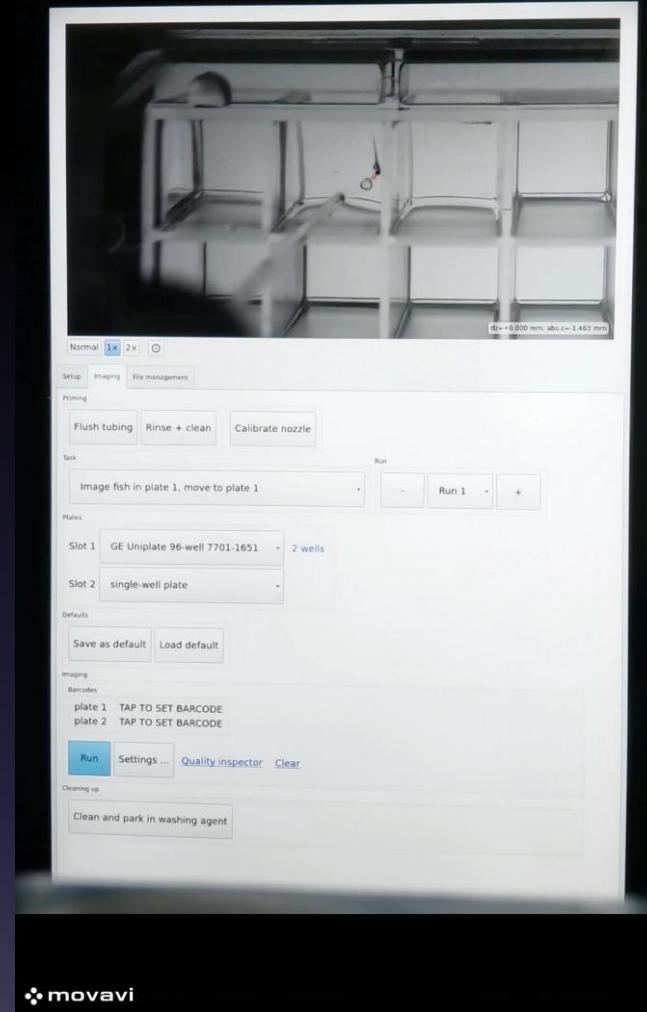
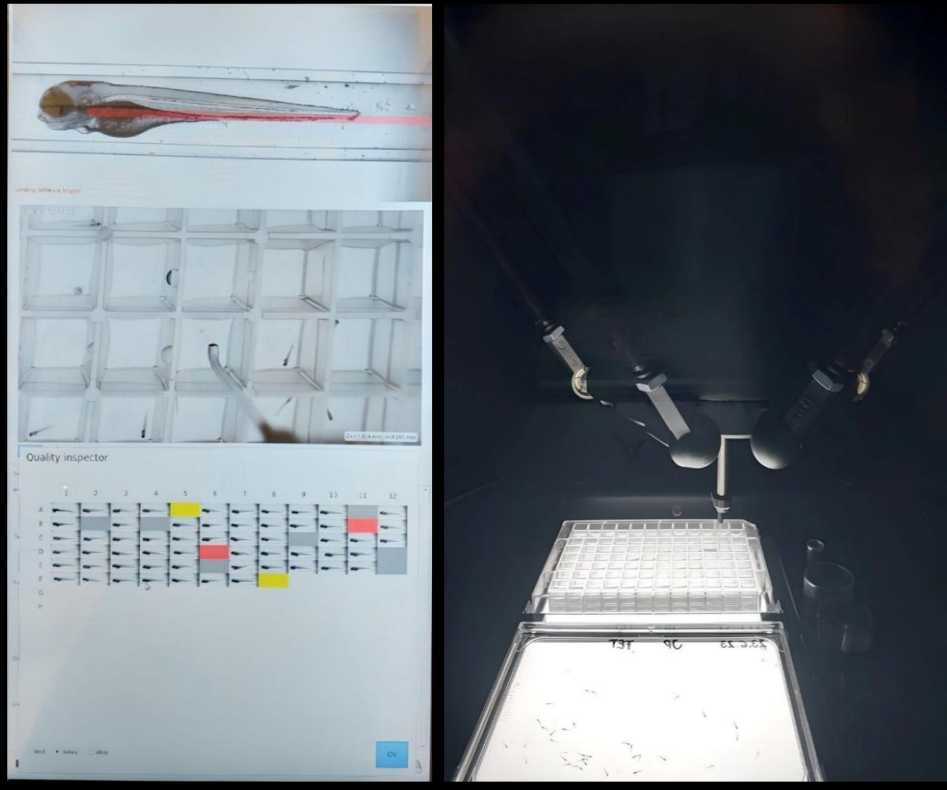
zebradánó lárvák flufenacet expozíciót követően, az embrionális fejlődés végén



A flufenacet egy széles körben, nagy mennyiségben alkalmazott gyomirtó vegyület, amely a per- és polifluoroalkilok (PFAS) csoportjába tartozik.

Automatizált Képképző Robot

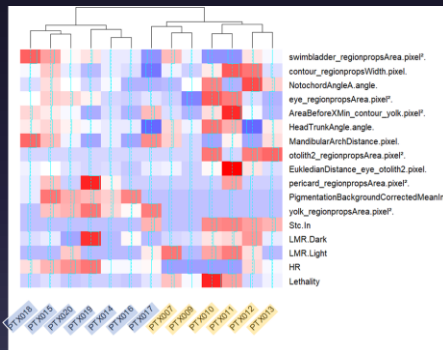
(Automated Imaging Robot – Life Science Methods)



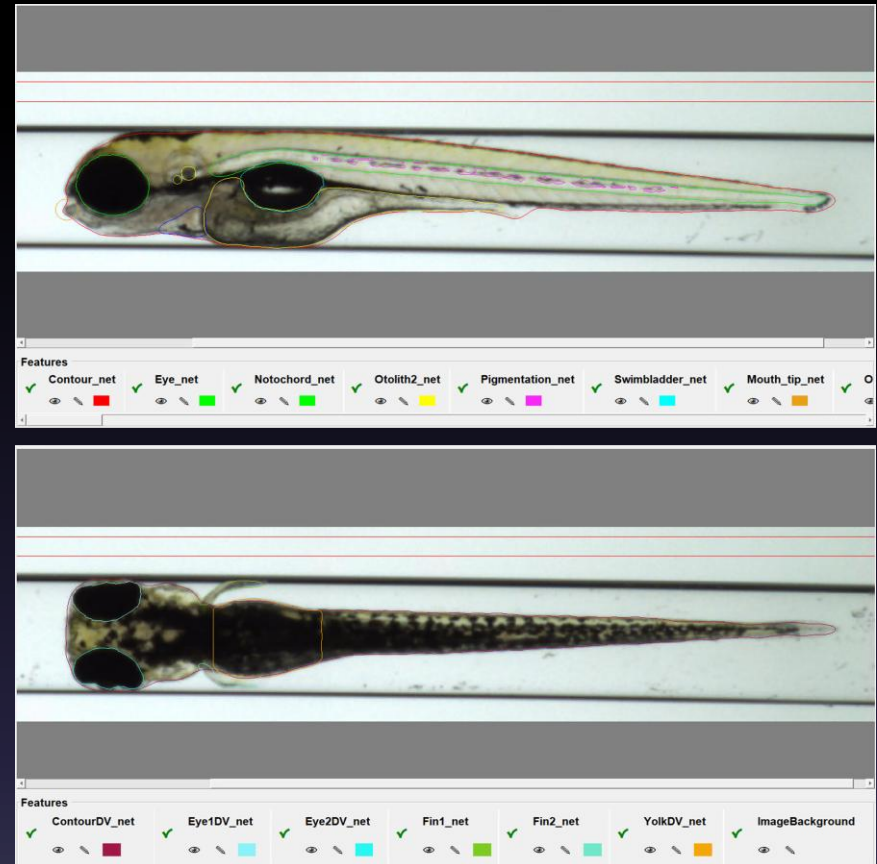
FishInspector 1.7 (UFZ)

elfogulatlan értékelés

- Gépi tanuláson (Deep Learning) alapuló működés, mely által a pontosság és a precizitás a használat idejével arányosan növekszik.
- 2D felvételeken képes az egyes testrészeket automatikusan felismerni.
- A képkoordináták alapján 74 különböző morfológiai végpont kerül kiszámításra (50 laterális és 24 dorzális)
- 2024-től nyílt forráskódú, ingyenesen elérhető szoftver:
<https://codebase.helmholtz.cloud/ufz/tb3-cite/biotox/FishInspector>

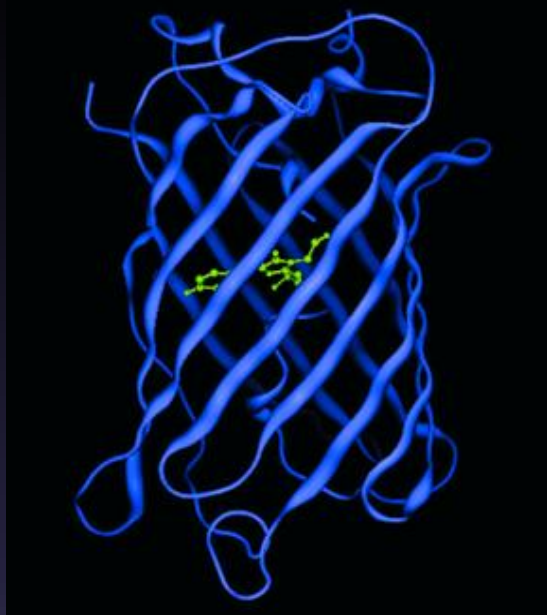


Massei et al. 2023

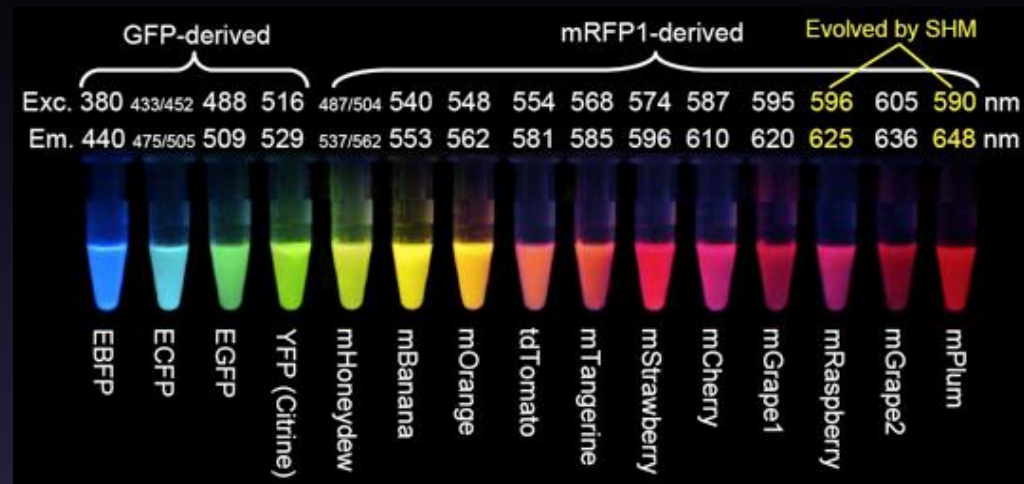


Legyen LÁTHATÓ a láthatatlan

- Transzgenikus vonalak-



GFP fehérje modellje



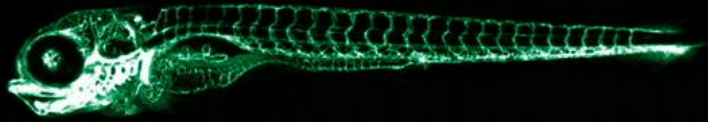
Különböző színű fluoreszcens fehérjék

(ZIMMER 2010)

A GFP felfedezése 2008-ban kémiai Nobel-díjat ért (Roger Y. Tsien, Martin Chalfie, Simomura Oszamu)



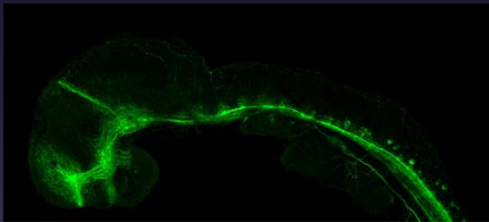
Példák a toxikológiai területén is felhasználható tg-s zebradánió vonalakra



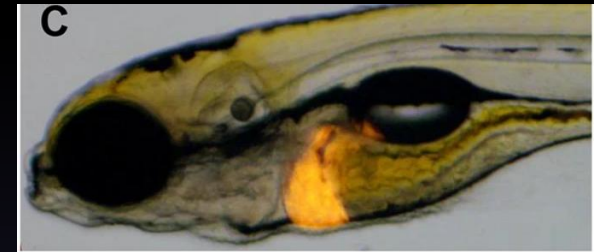
ÉR: Fli-1 (Friend leukemia integration site-1)
(GFP: zöld) (Lawson és Weinstein 2002)



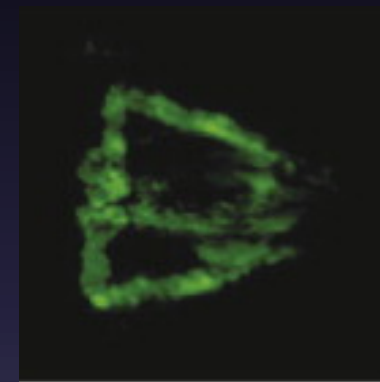
Vvsejt: GATA-1 (globin transcription factor-1)
(DsRed, piros) (Yaqoob et al., 2009)



Idegsejt: Neu (Neurogenin) (GFP;
zöld) zfin.org



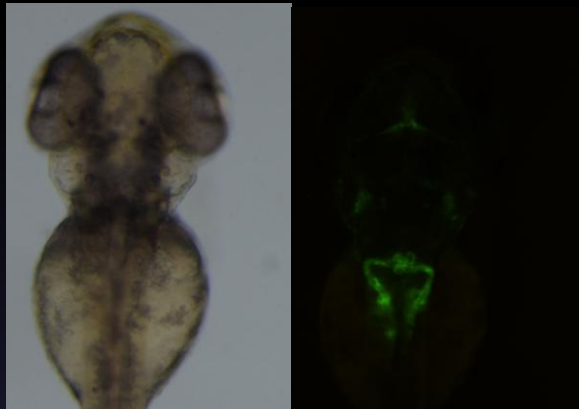
Máj: fapb1 (Fatty Acid-Binding Protein 1) (Venus: sárga)
Yan et al. 2023



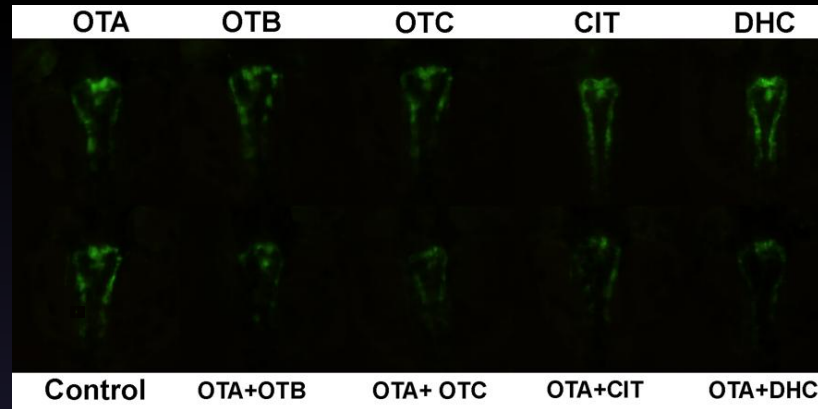
Pronephros (vese) :Wt1 (Wilms tumor
protein 1) (GFP: zöld) (Perner et al. 2007)

Példák a tg-s zebradánió vonalak segítségével megfigyelhető elváltozásokra

wt1 zebradánió embrió (vese)



mikotoxinok okozta elváltozások wt1:GFP zd.-kban (vese)



Kontrol

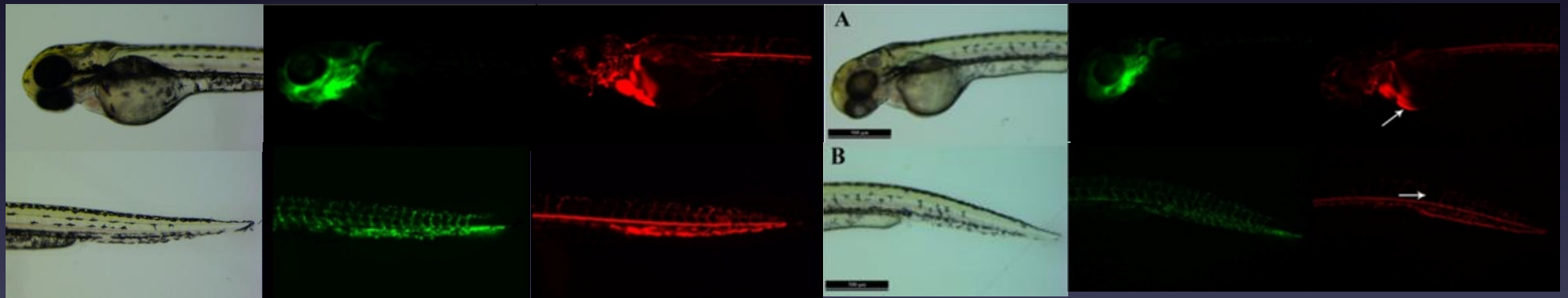
Fli (ér)

GATA (vvs)

Kezelt

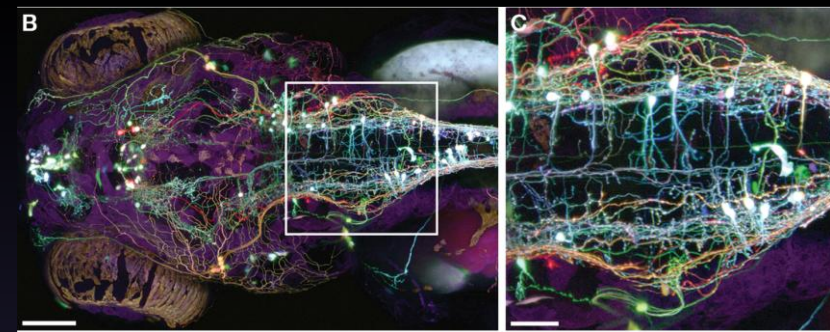
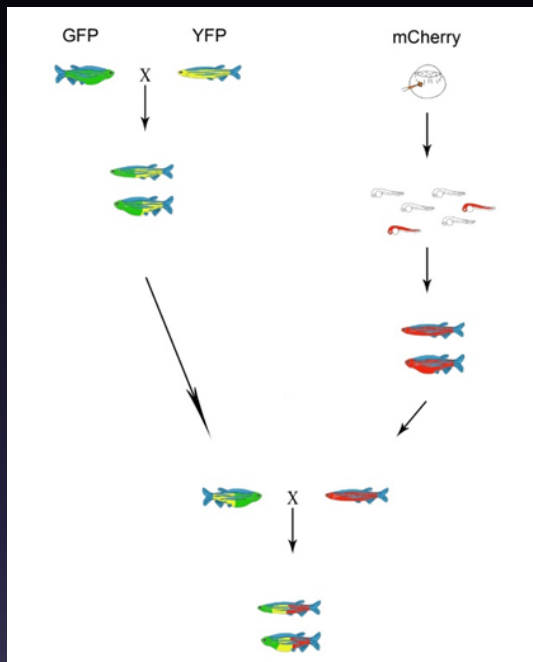
Fli

GATA

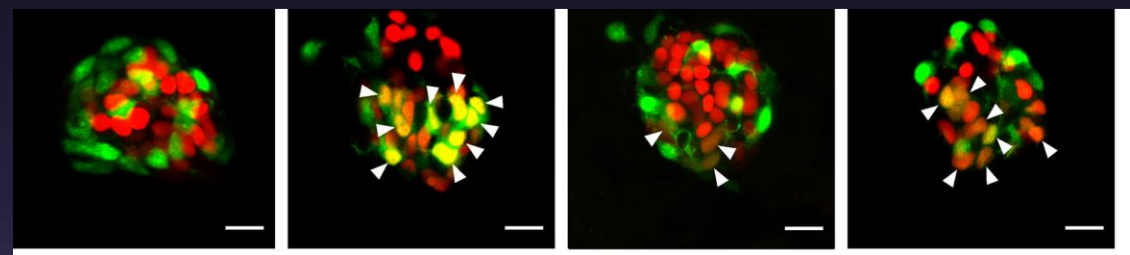


Multicolor ill. többszörös transzgenikus zd. vonalak

- Része lehet a 3R stratégiának - Egyedszám csökkentés!
- Gyorsabb, olcsóbb vizsgálat
- Ezek ellenére, nem túl sok ilyen vonal van.



„Brainbow zebrafish” (Pan et al. 2011)



Hasnyálmirigy (pancreas) alfa és béta sejtek dupla transzgenikus zebradánióban (Jia et al. 2021)

Transzgenikus biomarker vonalak

Biomarker/Biológiai marker: A biológiai rendszerekben történt változások vagy események indikátora. A biomarker egy molekuláris, sejtes vagy biokémiai változás, amely pontosan és megismételhetően mérhető, és felhasználható pl.: fiziológiai és patogén folyamatok vagy farmakológiai beavatkozásokra adott válaszok azonosítására és nyomon követésére.

Környezeti minták xenoösztrogén vizsgálatának nehézségei

- Több száz molekula rendelkezik hormonháztartást megzavaró hatással (EDCs- Endocrine-disrupting chemicals)
- A zömük ösztrogénhatású vegyület (több, mint 600)
- A vegyületek szerkezeti változatossága miatt különböző analitikai módszerek szükségesek a kimutatásukhoz
- Környezeti mintákban keverékek formájában vannak jelen a vegyületek
- A hatás oldalról történő megközelítés egyfajta megoldást jelenthet a problémára → *transzgenikus biomarker modellek használata*



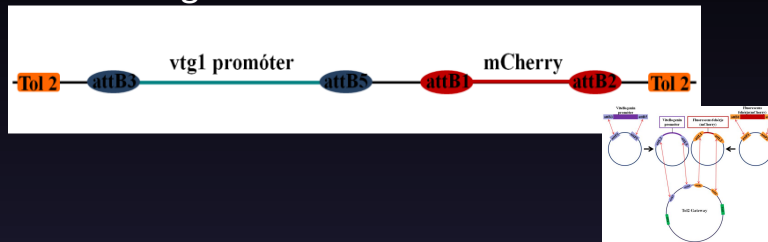
hulladéklerakók (1), szennyvíztisztító telepek (2), ipari tevékenység (3), háztartások és kórházak elfolyó vize (4), állattartó telepek (5) szántóföldek, gabonátárolók(6)

Kép: Csepeli
Andrea

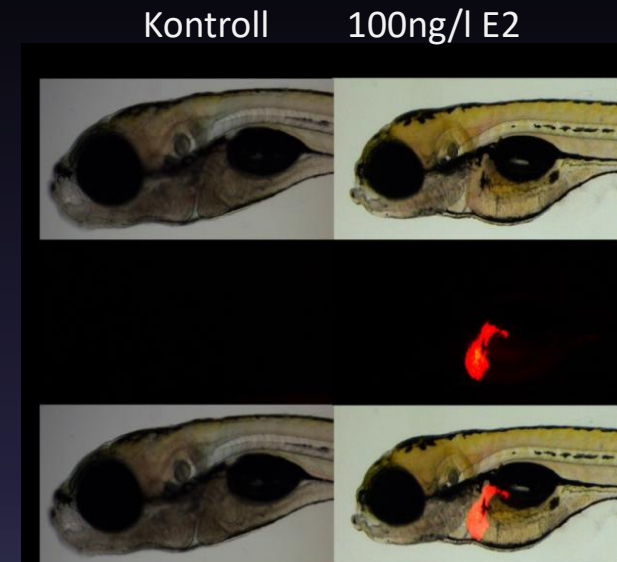
A tg(vtg1: mCherry) ösztrogén hatást kimutató transzgenikus bioszenzor zebradánió vonal előállítása

Vitellogenin (vtg) (szik előanyaga) — ösztrogénfüggő → Kifejeződése
 Egy élettani folyamatot fejt ki láthatóvá máj-specifikus

Tg konstrukció készítése



Mikroinjektálás; embriók válogatása (E2 kezelés); nevelés



A vonal elkészülte után még módszerfejlesztések és validálások szükségesek

Az alap kezelési és értékelési protokoll kidolgozása

1. Hol várjuk a jelet a májban?

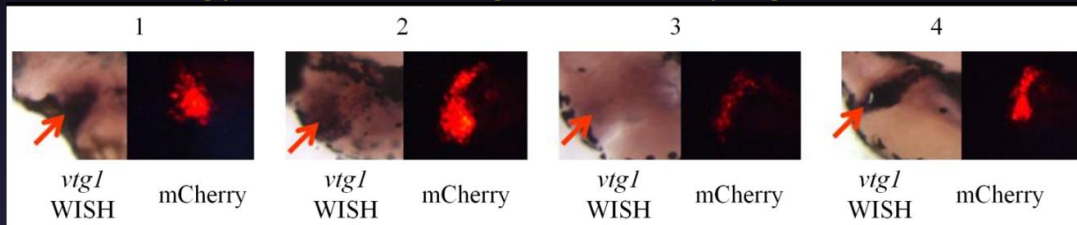


vtg1 (WISH)

fabp1 (WISH) Tao és Peng,

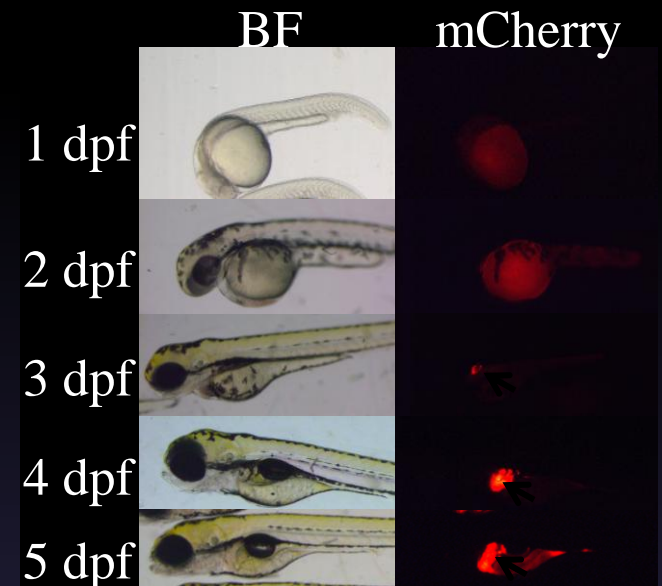
5 napos korban csak a bal oldali májleány termel vitellogenint:
Az embriót a jobb oldalára fektetve kell fényképezni

3. Van-e egyedei különbség az érzékenységben?



A vitellogenin és a fluoreszcens jel azonos területen, de a *vtg* kifejeződés mértéke és az érintett terület az embriókban különböző:
Magasabb embrió- és ismétlésszámot kell használni.

2. Mikor és hogyan jelenik meg a fluoreszcens jel?



A máj 3 napos korban kezd fejlődni, a jel is ekkor jelenik meg: Nem kell feltétlenül a termékenyülés után közvetlen elkezdni a kezelést. Érdeemes 5 napos korig kezelni.

Bakos et al. 2019

WISH (Whole-mount in situ hybridization): Az embriókban expresszált RNS-ek elhelyezkedésének megjelenítésére használt általános technika; dpf: (days post-fertilisation) a termékenyülés után eltelt nap/ok száma; BF: bright field

A fluoreszcens jel kiértékelése (ImageJ)

1. Fénymikroszkópos (BF) és fluoreszcens (mCherry) felvételek készítése minden embrióról, pontosan ugyanazokkal a beállításokkal.
2. A fluoreszcens felvételek megnyitása az ImageJ programmal
3. A felvétel szétbontása RGB csatornák szerint (Image/Colors/Split Channels).
4. Az R(ed) csatornán a máj pontos kijelölése (Oval)
5. Integrált Denzitás (IntDeg; ID) érték meghatározása a szoftverrel (Analyse/Measure)
6. A felugró táblázatban az IntDen oszlopban jelenik meg az érték.
7. Addig folytatni az értékelést, míg minden embrióra el nem készül, majd statisztikai módszerekkel elemezni az eredményeket.

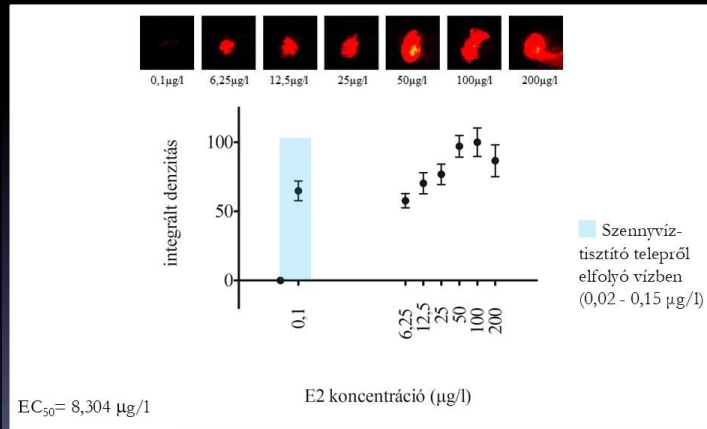


Csenki et al. 2020

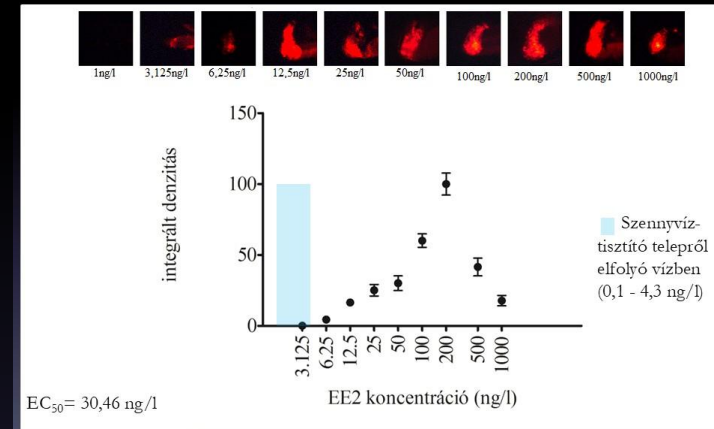
Integrált Denzitás: A világító terület nagyságából és a világítás intenzitásából származtatott érték.

Tesztelés referenciavegyületekkel

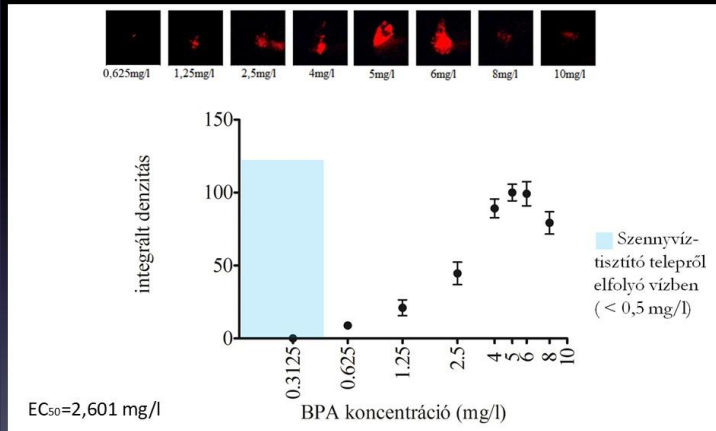
17- β -ösztradiol



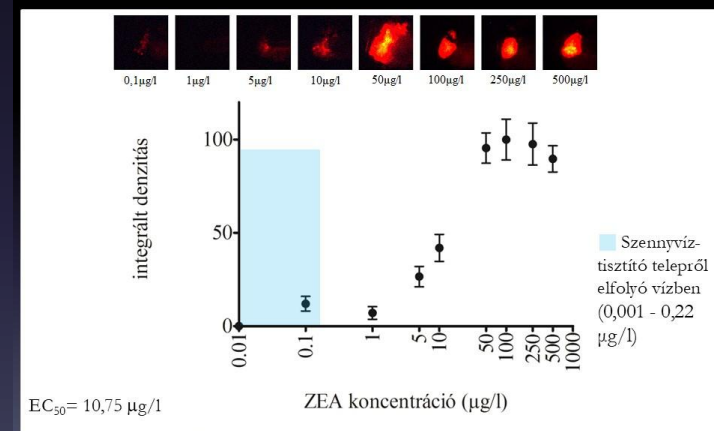
17- α -etinil-ösztradiol



Bisfenol-A

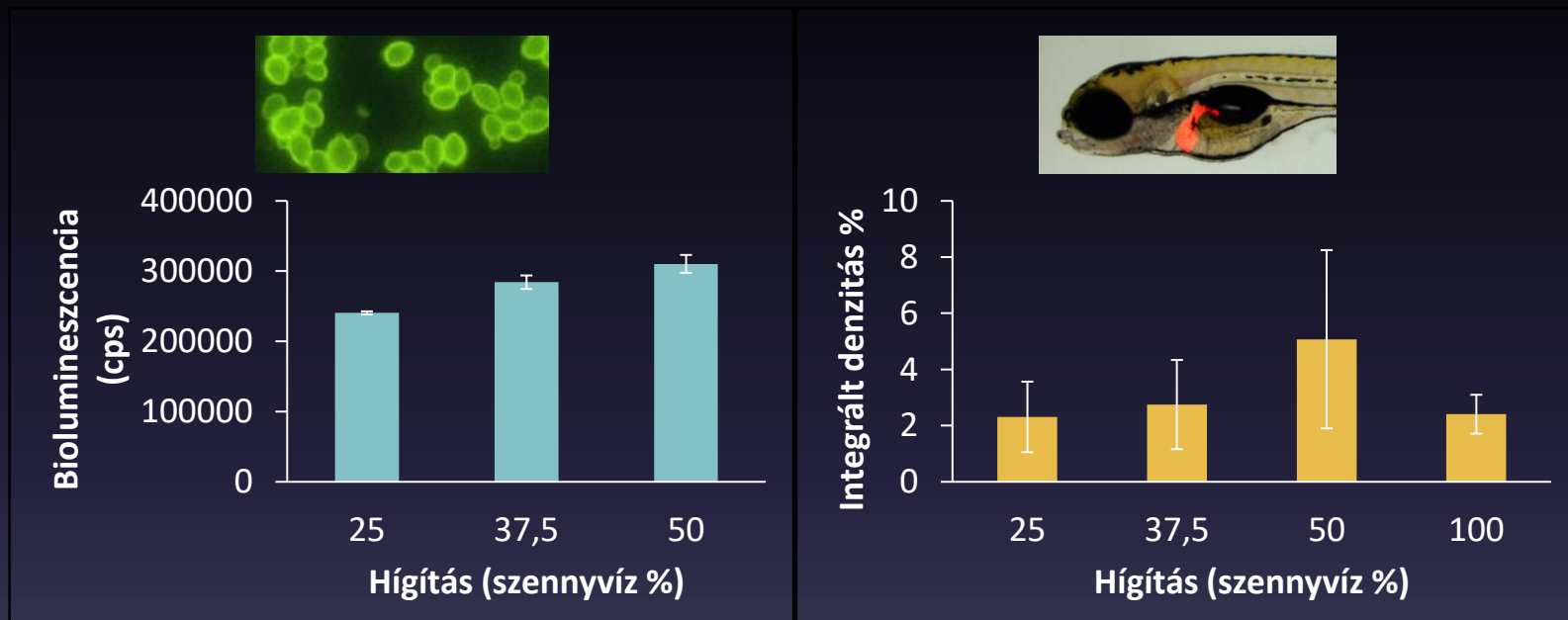


Zearalenon



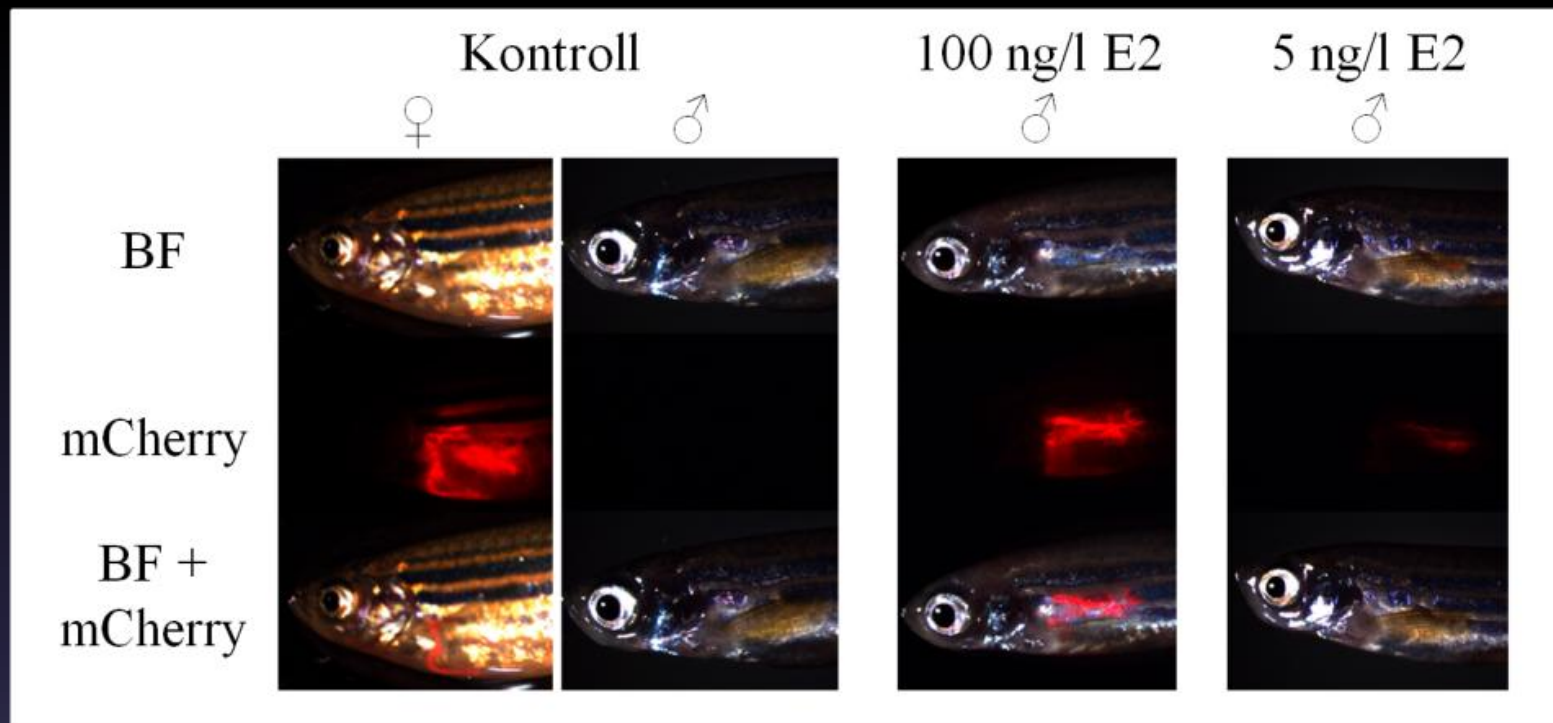
Valóban használható környezeti mintákon?

- 5 szennyvíz minta (pelyhes, eleveniszapot is tartalmazó fázis)
- Vizsgálat a tg vonallal és ösztrogénhatást kimutató élesztővel (BLYES)- validálás
- Ösztrogénhatás mindkét módszerrel 1 mintában



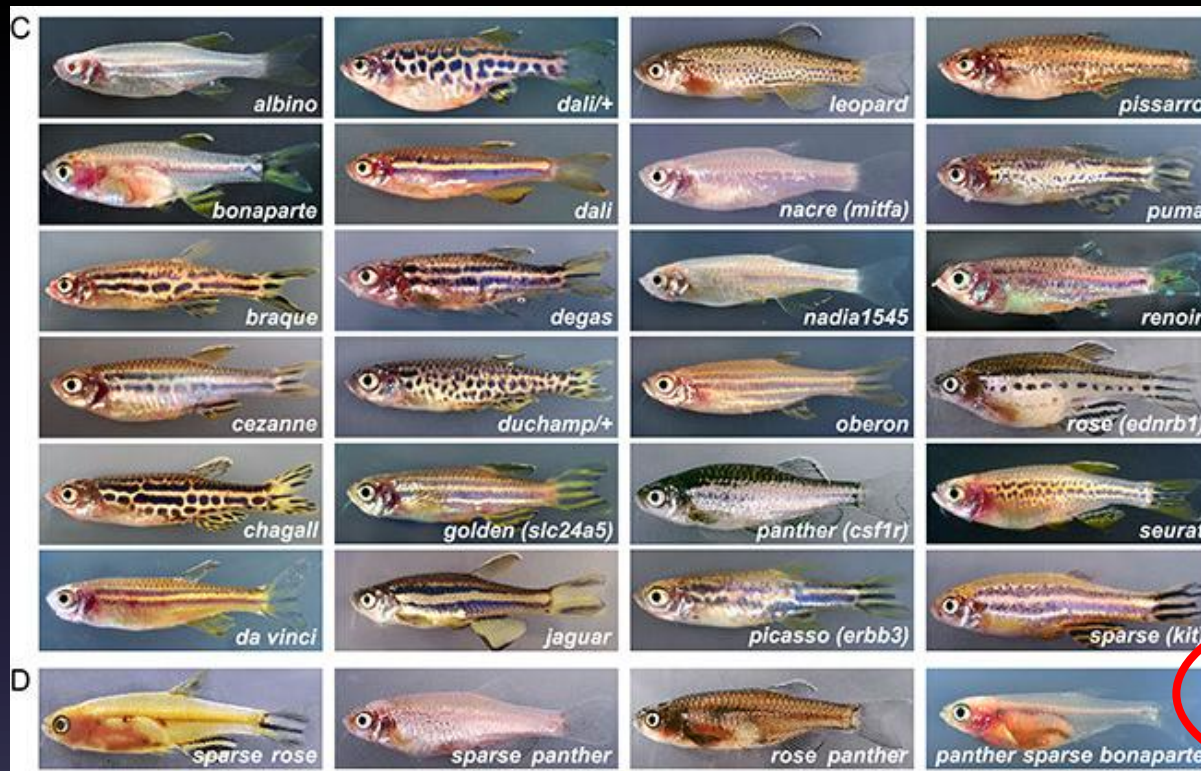
Mi a helyzet kifejlett korban a vizuális vizsgálatokkal?

tg(vtg1: mCherry) adult egyedek



Az adult hímek kb. 10x érzékenyebbek az ösztrogénhatású anyagokra, mint az embriók.

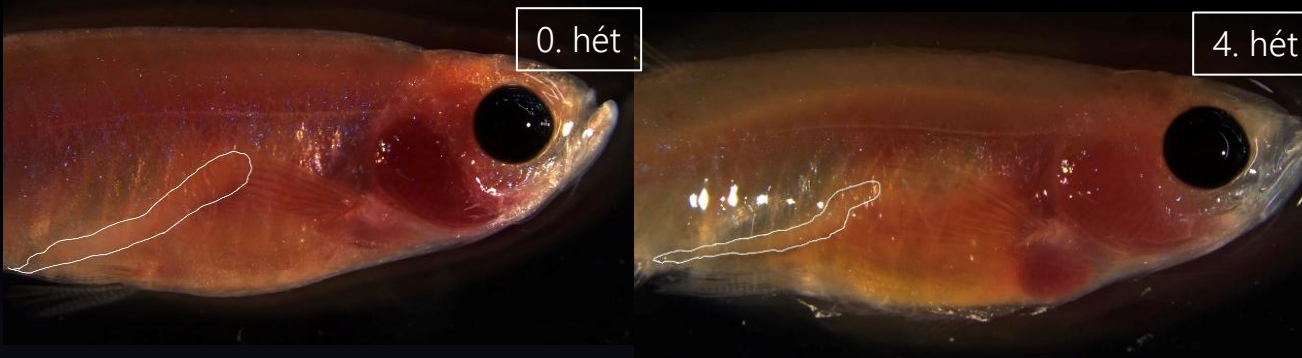
Pigmentmutáns zebadánió vonalak



<http://faculty.washington.edu/dparichy/pigment-pattern.html>

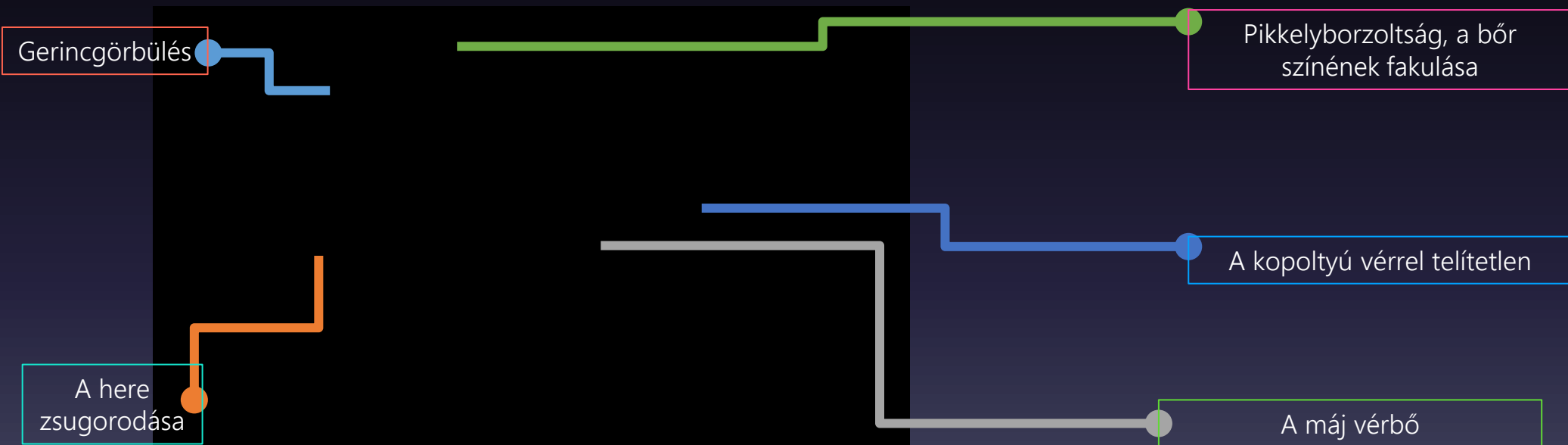
White et al. 2008

Szervi elváltozások nyomon követése ösztrogén kezelések hatására



Vizsgálat menete:

- Adult tejes példányok krónikus kitettsége (4 hét) 100 ng/l EE2 vegyületnek
- Minden héten fénymikroszkópos fényképezés és fluroescens fotózás



Összefoglalás

- A vizuálisan megfigyelhető (fenotípusos) értékelések a vizsgált anyag hatásainak részletes feltérképezését teszik lehetővé.
- A zebradánió embriók/lárvák alkalmasabbak ezekhez a vizsgálatokhoz, mint az idősebb egyedek.
- A transzgenikus vonalak segítséget nyújtanak a vizuális vizsgálatokhoz.
- A hatásoldalról vizsgáló, biomarker transzgenikus vonalak előállításában és alkalmazásában nagy lehetőségek rejlenek.

Dr. Csenki-Bakos Zsolt

MATE Környezettoxikológia Tanszék

Csenki-Bakos.Zsolt.Imre@uni-mate.hu



Állatbiotechnológia

- ahogyan azt nagyon sokan elképzelik-



KLÓNOZÁS



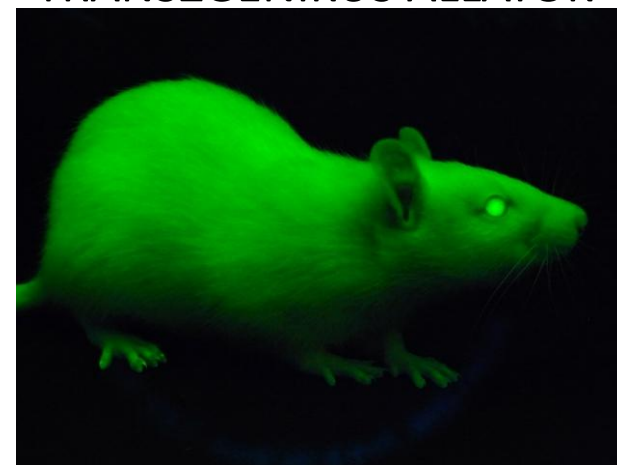
TRANSZGENIKUS ÁLLATOK



CSODAGYÓGYSZEREK



EPIGENETIKA





... és amilyen valójában:

- Tényleg vannak izgalmas, kicsit misztikus „high science” területek:
 - Klónozás
 - Epigenetika
 - Személyre szabott gyógyászat
 - Stb...

- De vannak a mindennapjainkat is érintő területei:
 - Toxikológia
 - Transzgenikus állat előállítás
 - Humángyógyászati termékek, betegségmodellek
 - Természetvédelem
 - Állattenyésztés
 - Stb...



Klónozás



A leghíresebb klón: **Boba Fett**

Google: 95 000 000 találat (0,65 másodperc)



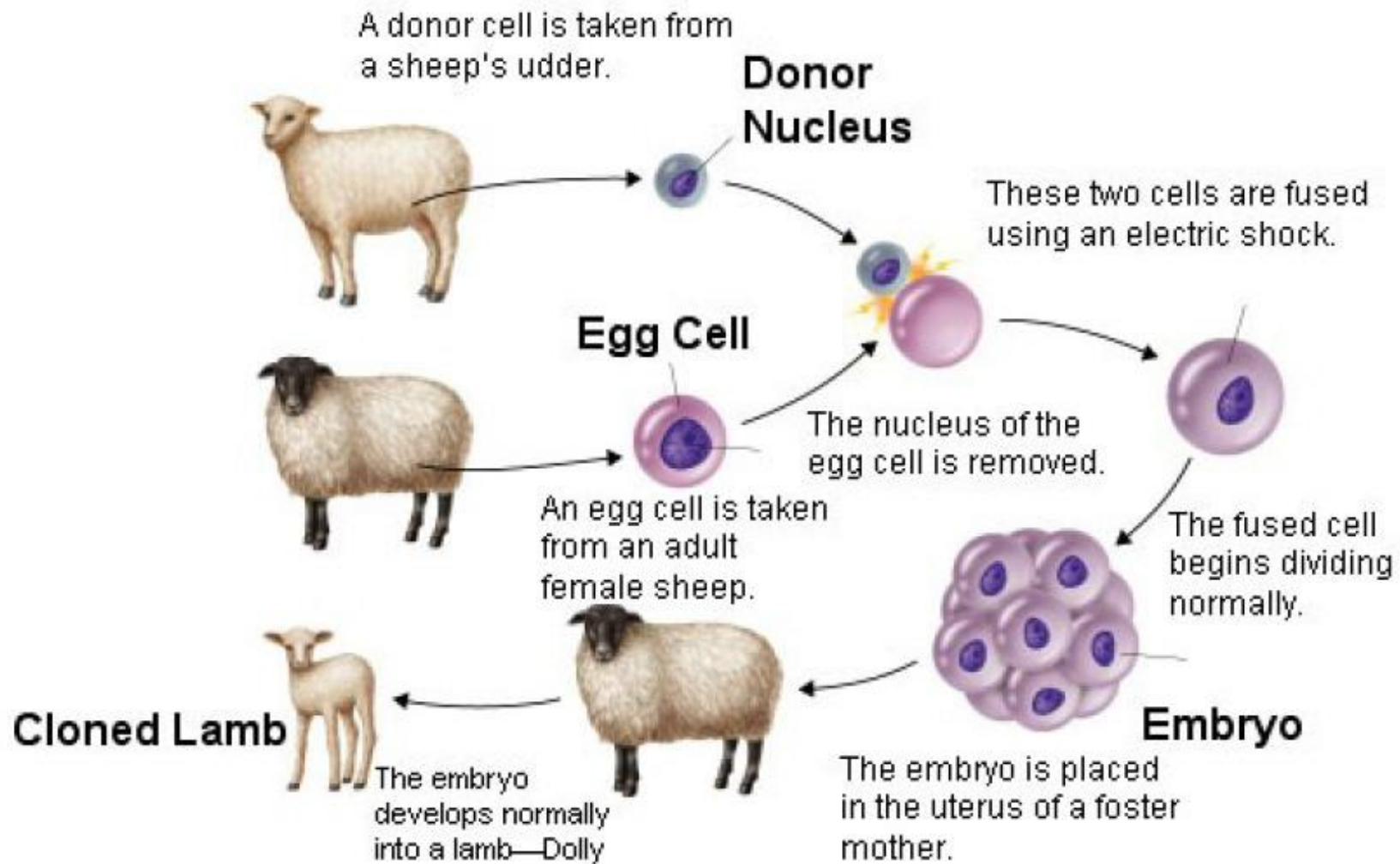
...szegény **Dolly** csak a második

Google: 21 400 000 találat (0,54 másodperc)

5 July 1996 Roslin Institute, Edinburgh, Scotland

Dolly Parton 49 200 000 találat (0,46 másodperc)





Előnyök:

- Értékes állatok gyors elszaporítása
- Állatnemesítés gyorsítása
- Veszélyeztetett fajok megmentése (na itt jön a képbe a Mamut...)
- Alap kutatási célok

Hátrányok:

- Drága
- Bonyolult
- Alacsony hatékonyság
- Magzati/újszülött rendellenességek
- Genetikai újraprogramozás???



Prof. Dr. Dinnyés András és csoportja MBK



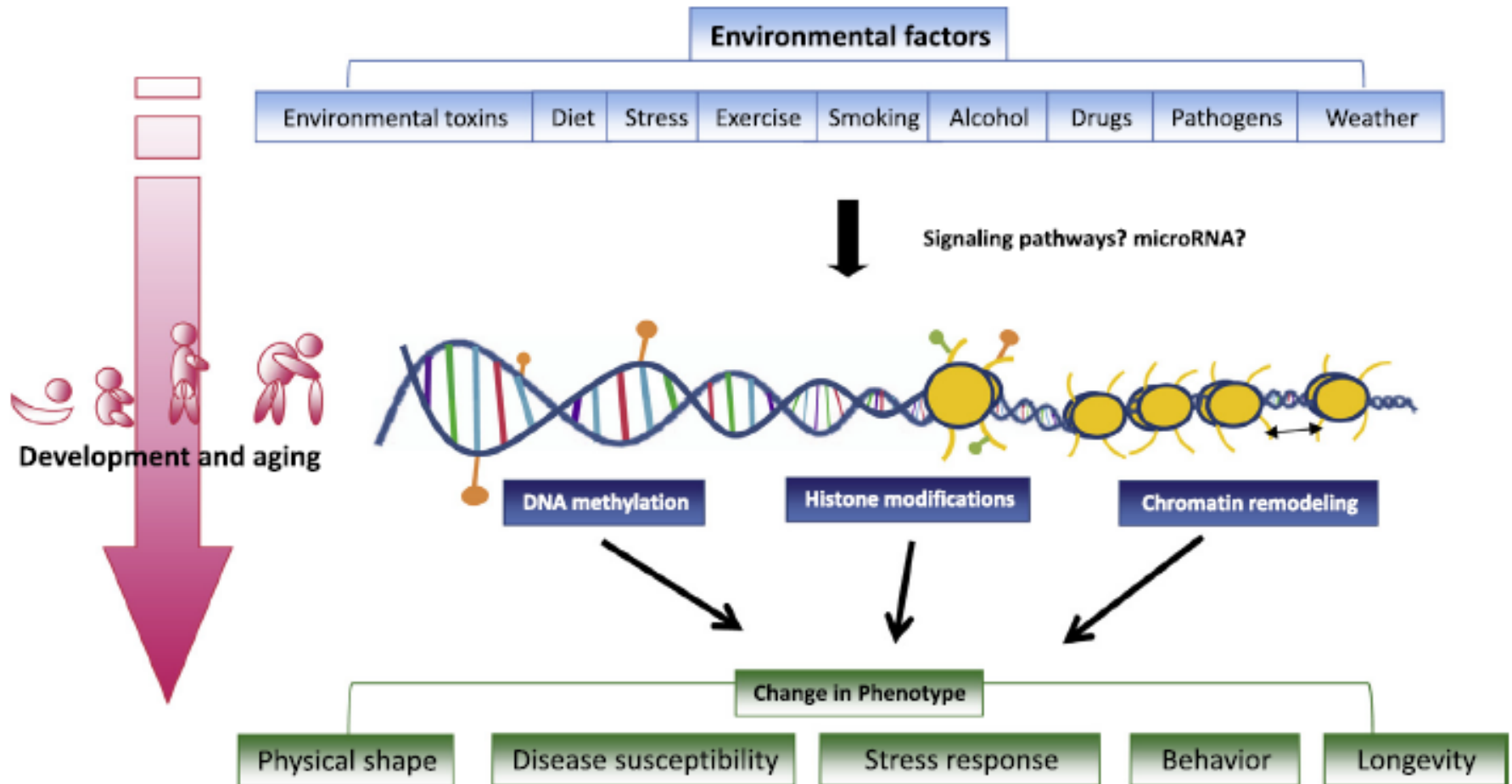
2006 Klonilla gyermekeivel



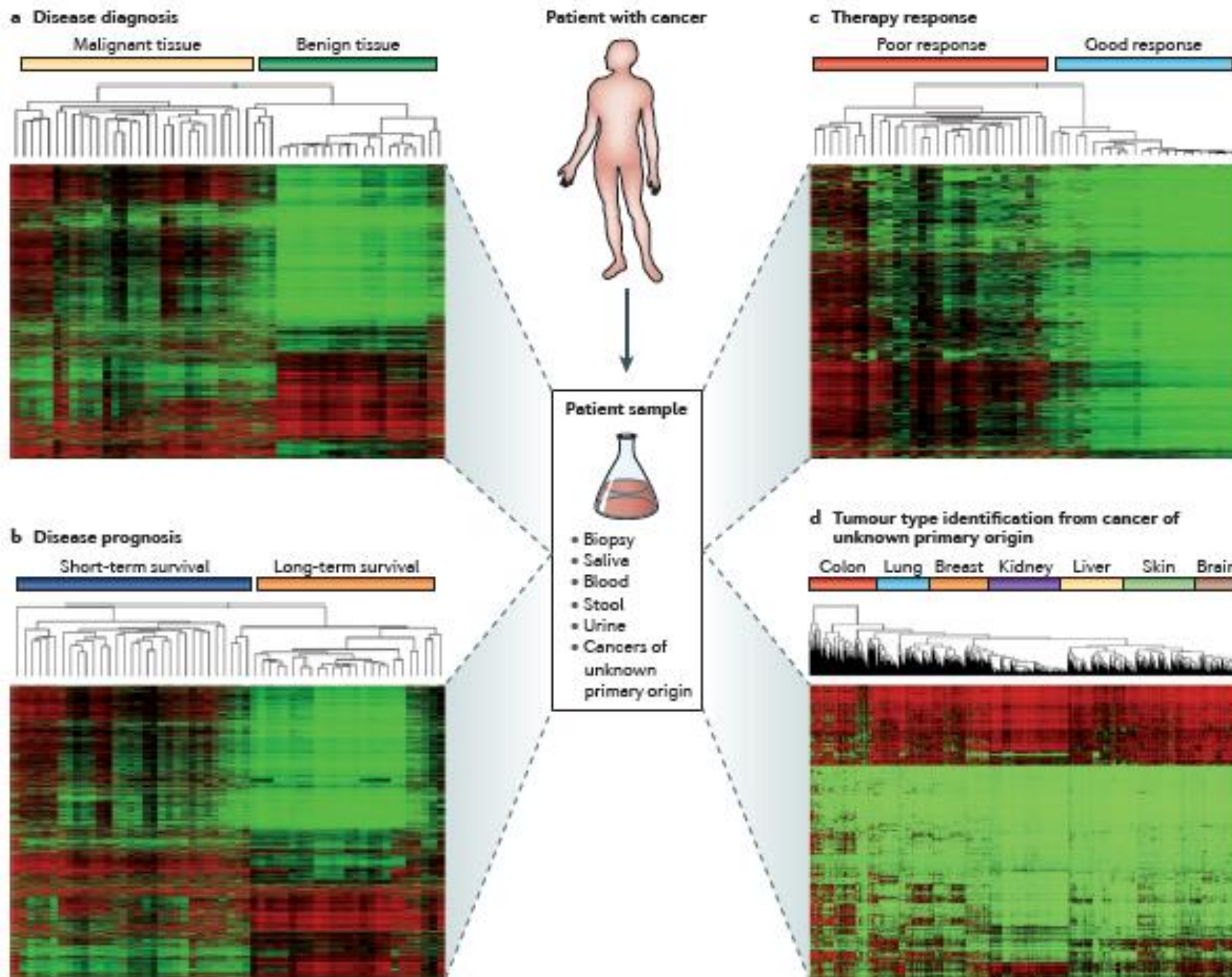
2007 Tapsilla (másfél évesen)

EPIGENETIKA az új „celeb”

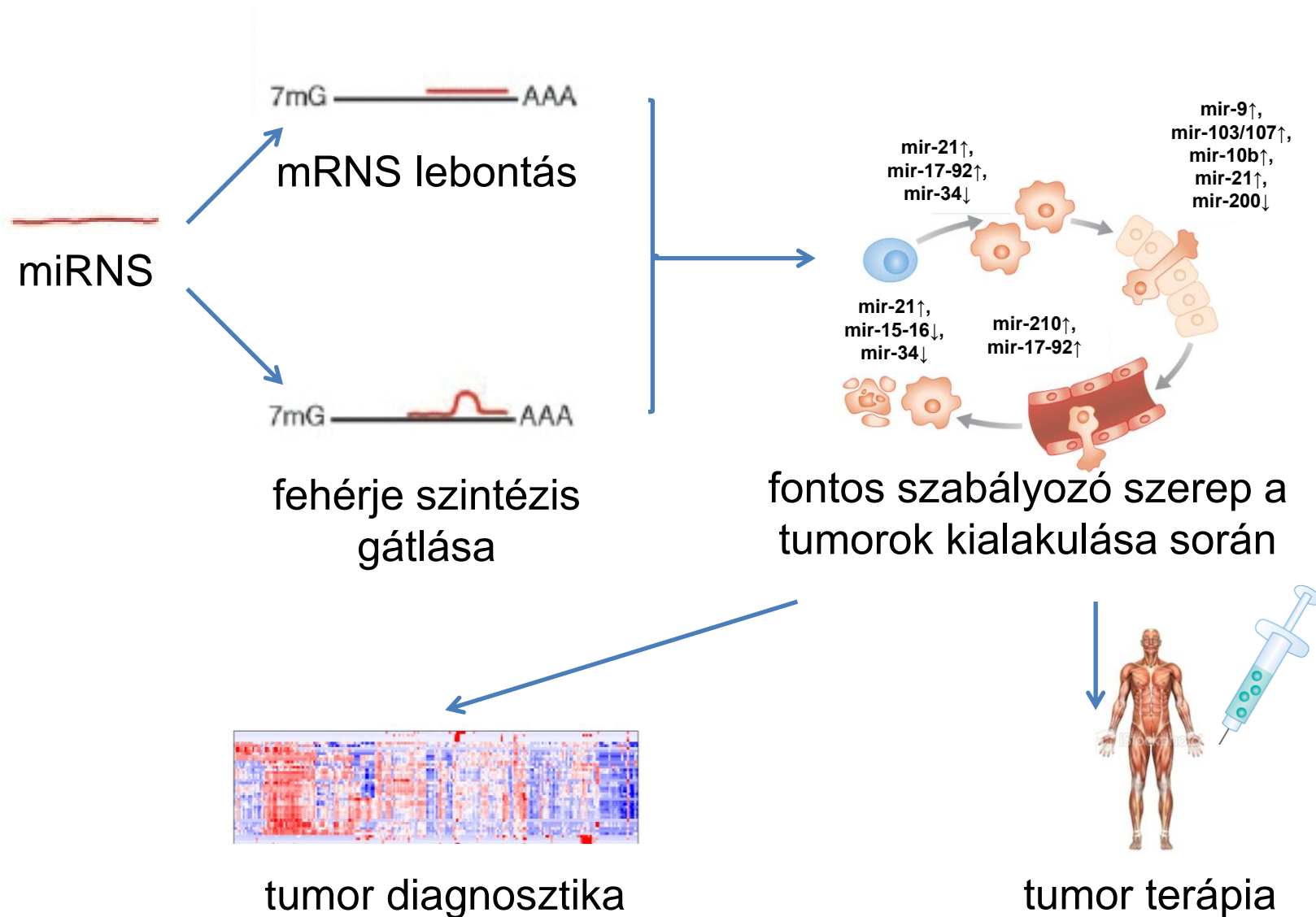
Az epigenetikai módosítások képezik a hidat a környezeti faktorok és az általuk kiváltott fenotípusos változások között



A DNS metiláció alkalmazása betegség biomarkerként

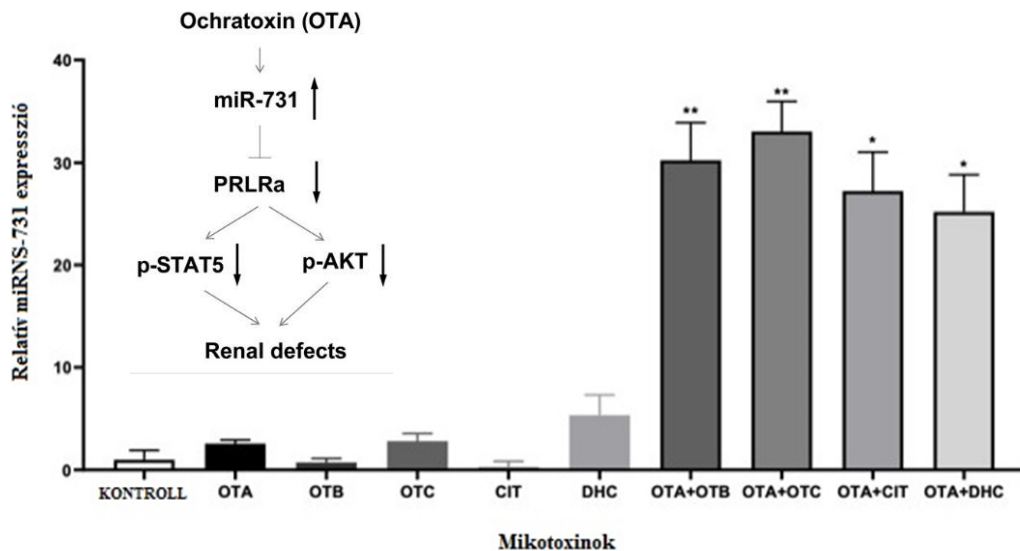


MiRNS-ek alkalmazása a tumor diagnosztikában és terápiában

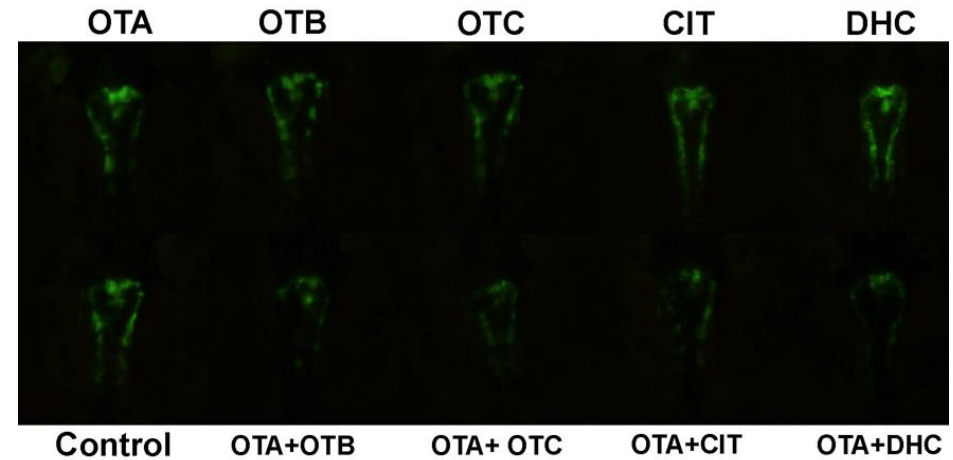


MiRNS-ek alkalmazása a toxikológiában

Kombinált mikotoxinkezelések hatása a miR-731 miRNS expressziójára és a vese fejlődésére Tg(wt1:GFP) embriókban



Génexpressziós változás alátámasztása fenotípussal
→ vad típusú vonalon ez nem lenne megfigyelhető



A miR 731- vízháztartást, szervfejlődést befolyásoló útvonlon keresztül hat. (Wu et al. 2016)

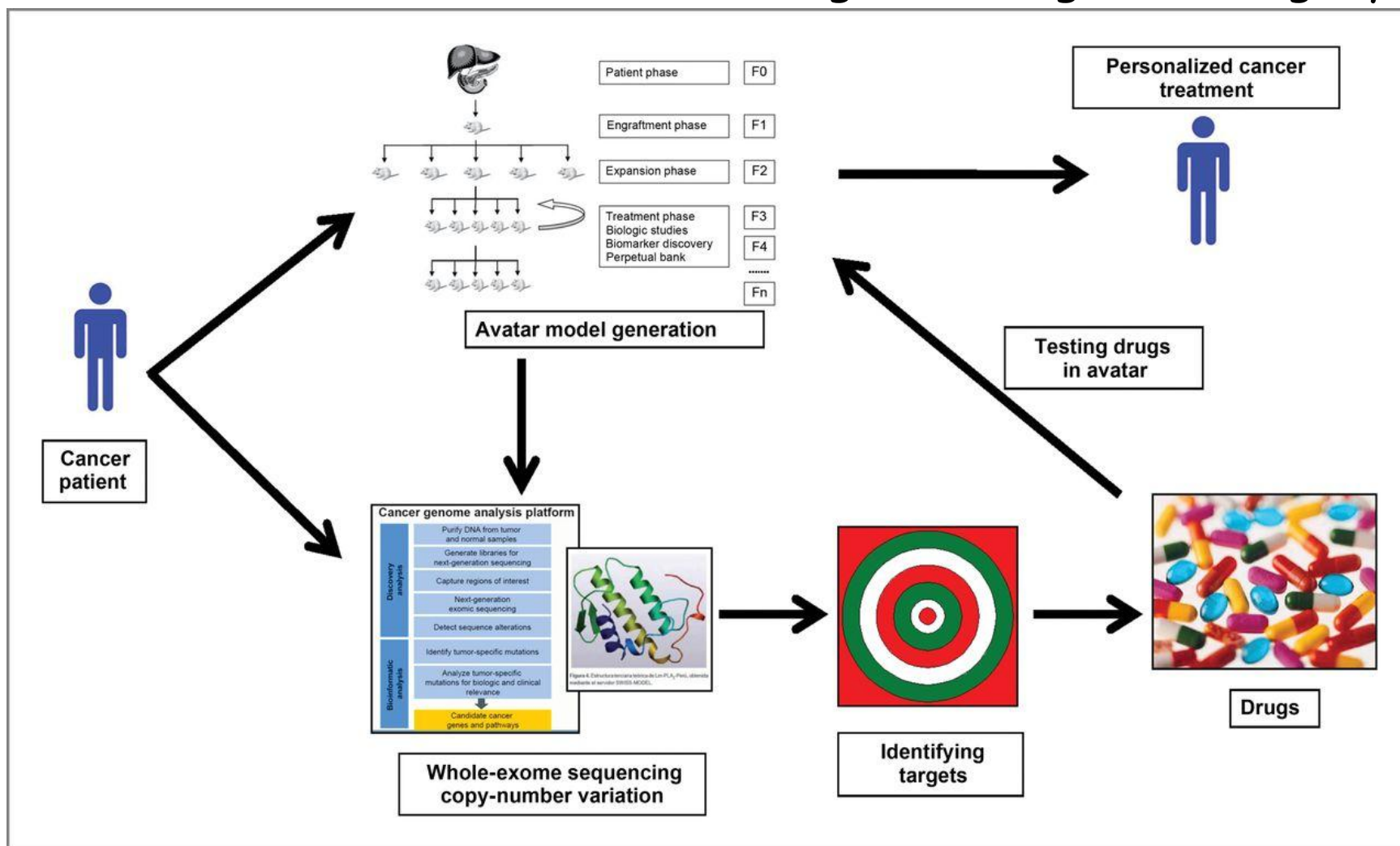
Expozíció	Koexpozíció
OTA: 0,23 µM	0,23 µM OTA + CIT: 3,125 µM
OTB: 2,58 µM	0,23 µM OTA + DHC: 3,125 µM
OTC: 0,055 nM	0,23 µM OTA + OTB: 2,58 µM
CIT: 3,125 µM	0,23 µM OTA + OTC: 0,055 nM
DHC: 3,125 µM	

Fejlesztünk ilyen markereket emlősre halon!
Lehet?
Igen 😊

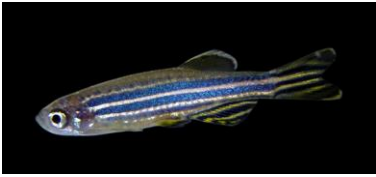
Személyre szabott gyógyászat

- Avatar modellek -

A módszer lényege, hogy rákbeteg páciensek tumorából izolált sejteket ültetnek be egér/patkány egyedekbe. Miután a tumor kialakult bennük, kikísérletezhetik rájuk a legmegfelelőbb gyógyítási módszert. A módszer működik, azonban igen költséges és időigényes.



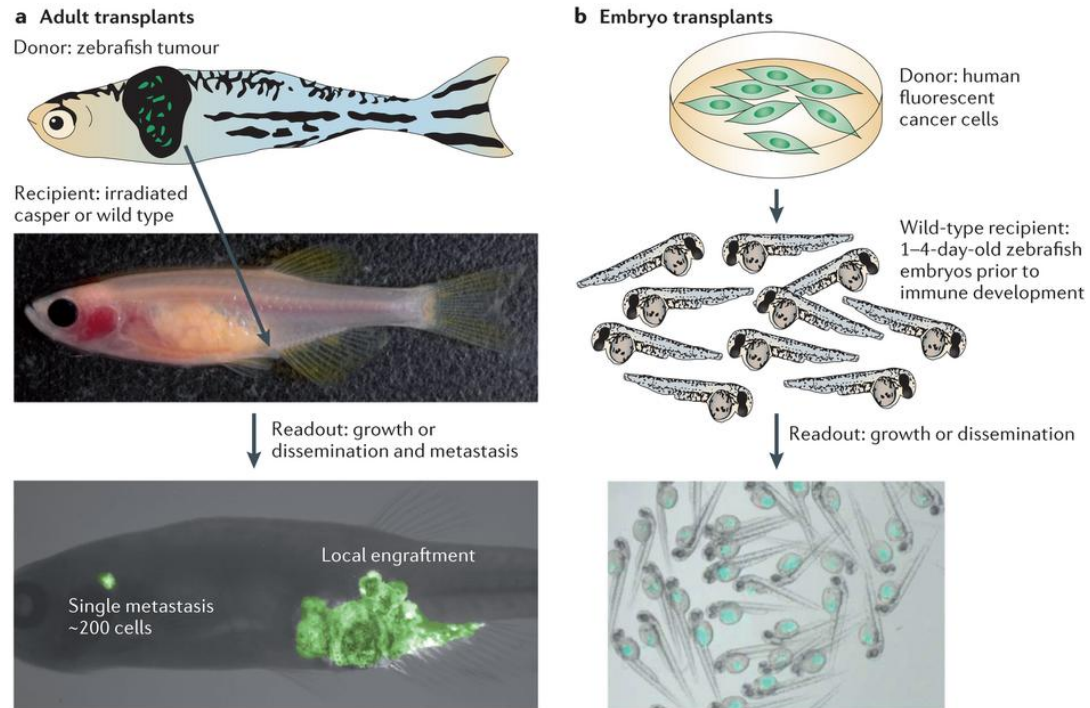
Hal - avatar



- Gyorsabb kiértékelés
- Olcsóbb vizsgálati alany
- Nagyobb mennyiségű tesztelési lehetőség
- 5 napos kor előtt gyakorlatilag nincs immunrendszere a halaknak
- Állatvédelmi törvények nem szabályozzák
- **Human sejtek --- Zebradánió sejtek hőmérsékletigénye eltérő** - ez a probléma jelenleg még megoldásra vár



Daganatos betegségek modellezése



Nature Reviews | [Cancer](#)

(White et al, 2013 *Nat Rev Cancer*)

Állatmodellek a laborban

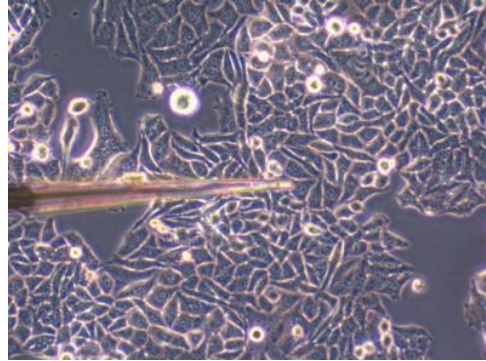
- és ami mögötte van-

- Emlős modellek (egér, patkány, nyúl stb.)
- 3R stratégia elterjedése
- Szigorodó állatvédelmi törvények
- High-throughput stratégiák alkalmazása
- **Szükség volt és van alternatív modellekre**



Alternatív modellek

Sejt- és
szövettenyészetek



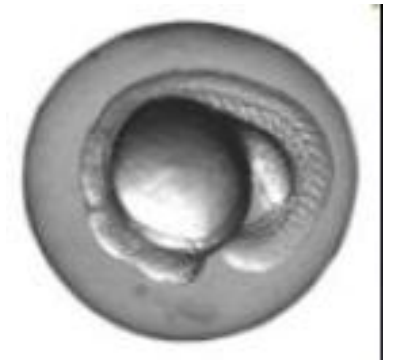
C. elegans

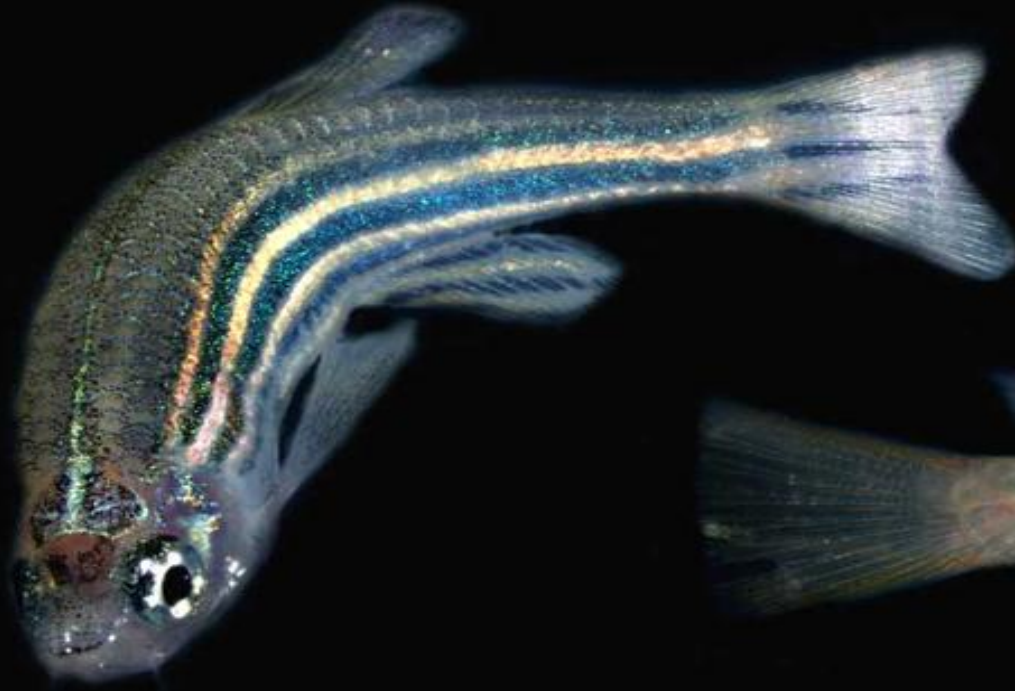


In silico modellezés



Halembriók





Danio rerio
(Cypriniformes)



Oryzias latipes
(Beloniformes)



Tetraodon nigroviridis
Takifugu rubripes
(Tetraodontiformes)

Miért pont a zebradánio?

- Népszerű akváiumi díszhal
- Békés természet
- Könnyen tartható, szaporítható
- Ivari dimorfizmus



<http://diszhal.info>



http://hac-aquascaping-contest.com/galeria_21.html

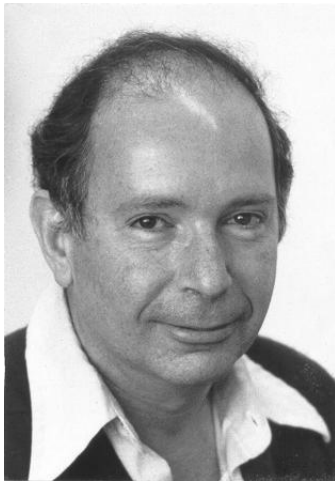


<http://akvarista.gportal.hu>



<http://www.origo.hu>

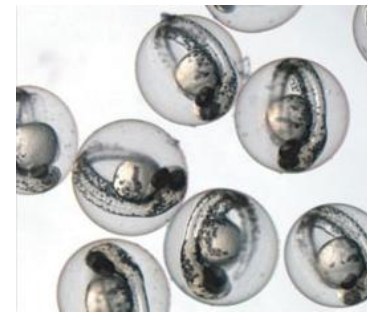
Természetesen „magyar szála” is van a történetnek



Streisinger György

Zebradánió, mint modell

- kis méret (~ 3-5 cm)
- rövid generációs idő (~ 3 hónap)
- nagy mennyiségű ivartermék (100-150 ikraszem/anya/hét)
- *ex utero* embriófejlődés
- gének, receptorok, molekuláris és élettani mechanizmusok → emlősökével (szinte) egyezik
- könnyű és olcsó kísérleti technikák
- teljes genom információ
- teljes életsiklus a vízben → hidrotóxicológia, környezeti kockázatbecslés

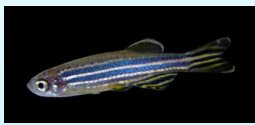




A laboratóriumi modellek összehasonlítása

Toxikológiai vizsgálatok megoszlása: 80% egér/patkány; 10% zebradánió 10%-egyéb (kutya, tm, nyúl, béka stb...)

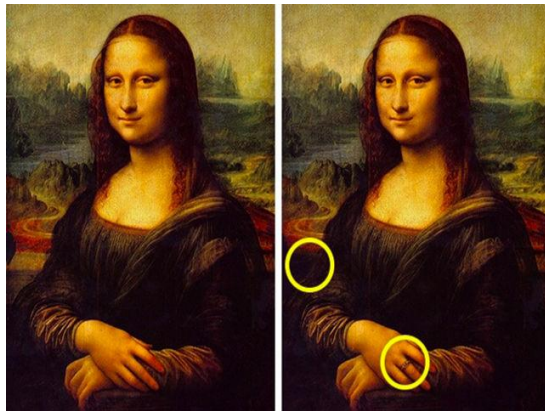
Homológ gének (70% az emberi génekkel)

Az emberi betegséghez kapcsolt gének 82%-ának van legalább 1 ortológja zd-ban

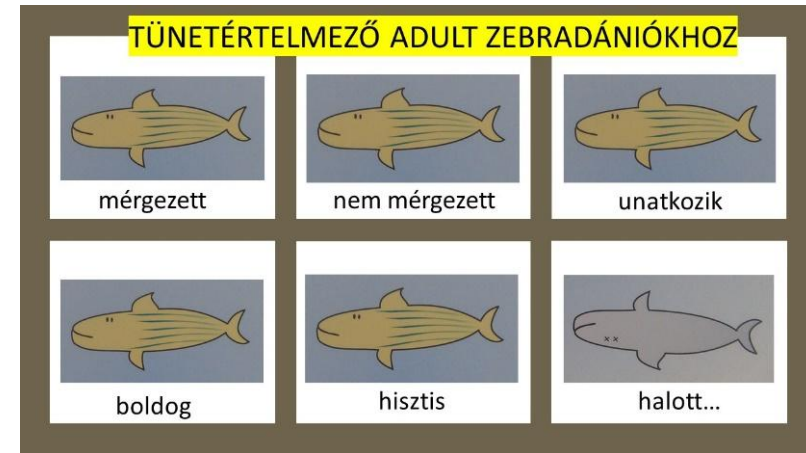
			
Tartási költségek	\$	\$\$\$	\$\$\$
Toxikológiai vizsgálatok	++	++++	+++
Transzgenikus és mutáns vonalak	+++	++	++
Célzott génmódosítás	+	++++	+
Transient in vivo assay	++++	+	+
Alkalmasság átfogó screening vizsgálatokra	++	+	+

Fenotípusos elváltozások keresésének lehetőségei zebradánión

- A hal „tünetszegény” modell.-Adult halak esetében ez általában igaz, az embriók vizsgálata ebből a szempontból előnyösebb.
- Vad típusú és transzgenikus embriókat is használhatunk a vizsgálatokhoz.
- A fenotípus vizsgálat erre a játékra hasonlít: Keresd a két különbséget a két kép között...



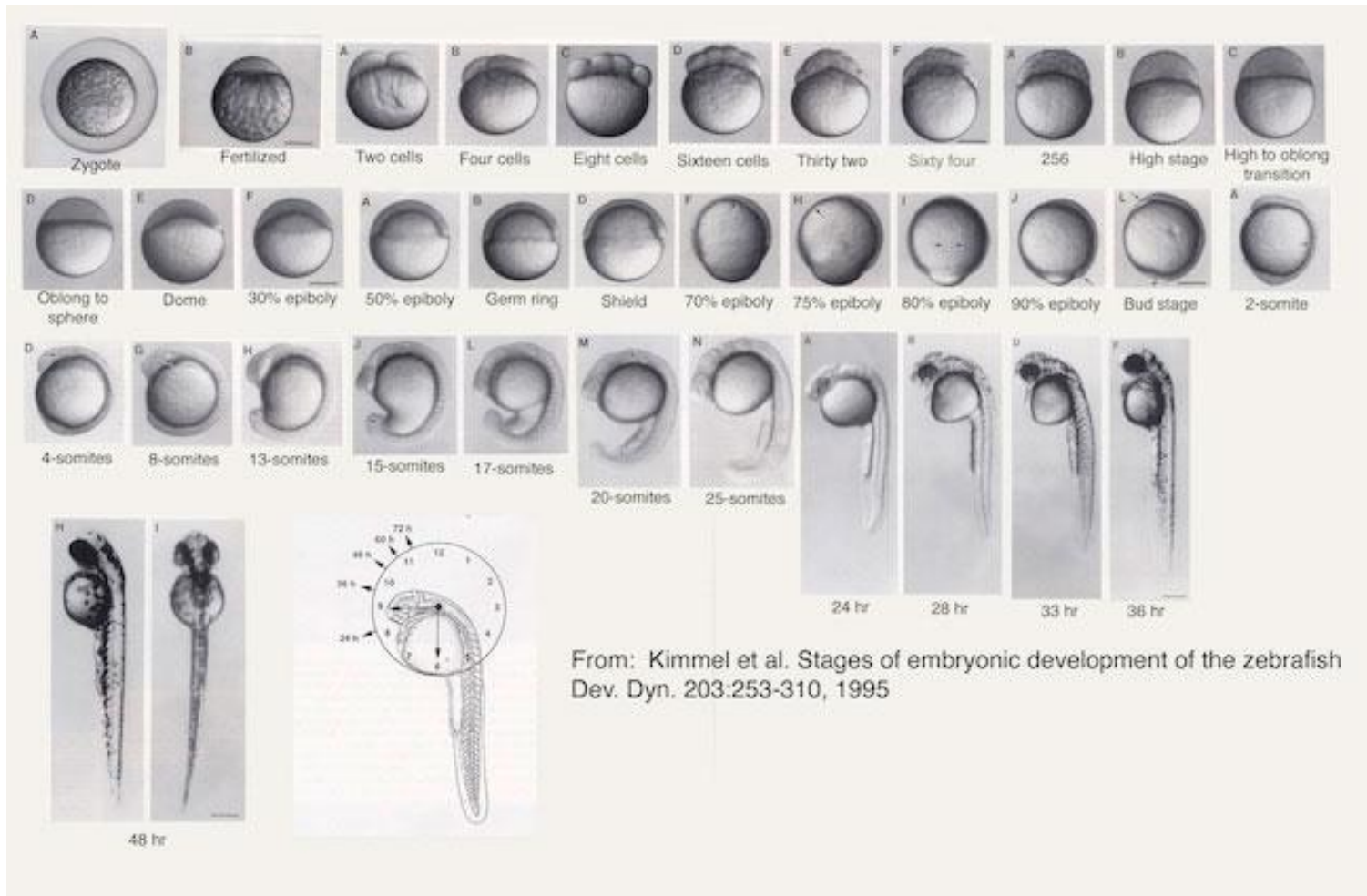
... a nehezítés csak annyi, hogy senki nem mondja meg előre mennyi különbség lesz.



Emberben is van „tünetszegény”, de azért nem ez az általános



„A sorvezető”- A zebradánió embriók egyedfejlődése

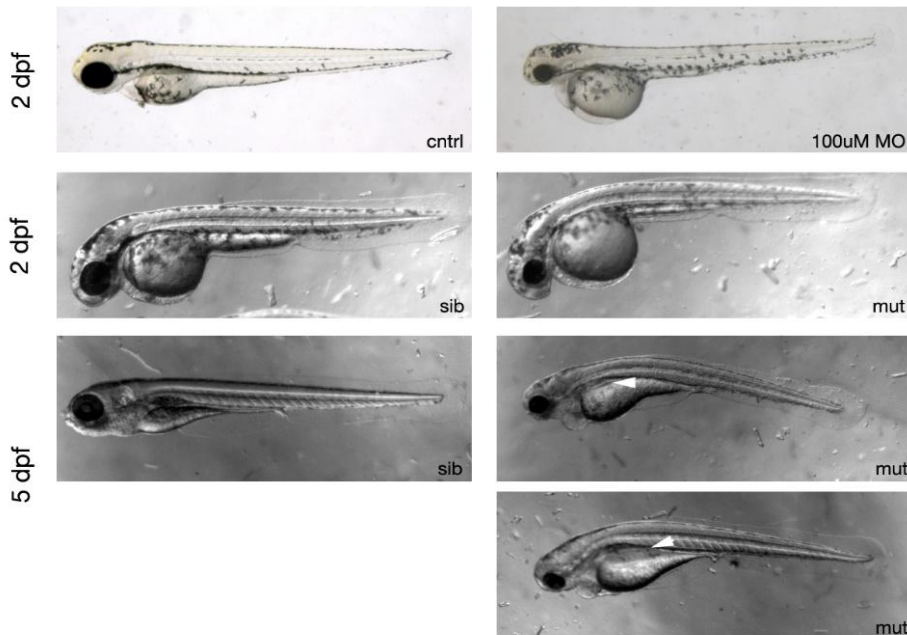




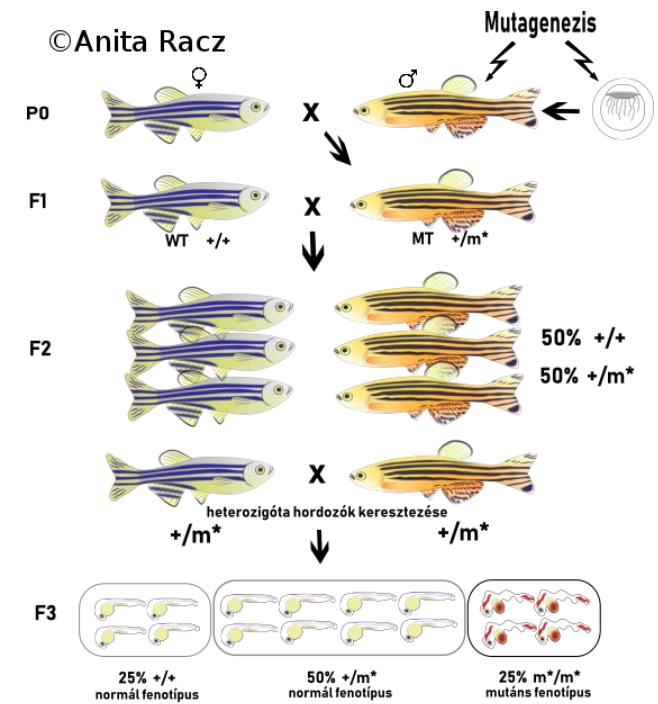
A zebradánió, mint kutatási modell használata



- Gene loss of function
- Gain of function
- Manipulációs-módosítási technikák- mutagenesis

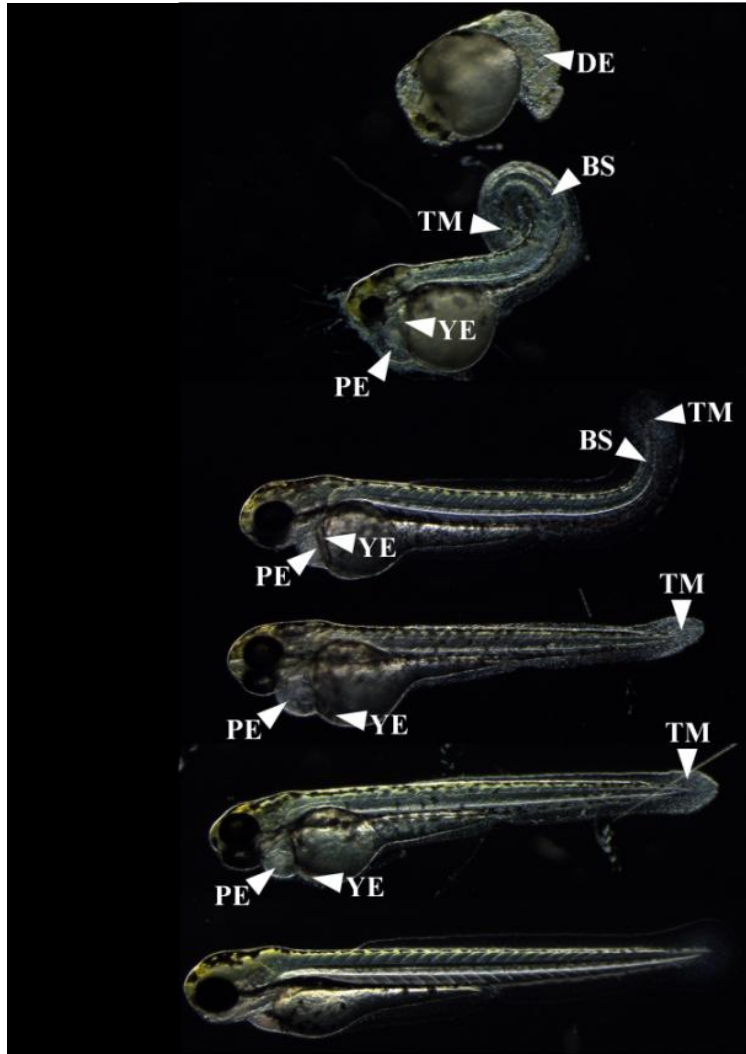


A vizsgált gén loss-of-function fenotípusa, knock-down (funkcióvesztés) tesztelés- morpholino injektálással



A mutagenesiszel véletlenszerű vagy specifikus mutációk indukálhatóak, amelyek stabil és öröklődő mutációs változásokat okoznak (lehet vizsgálni a hátterét..)

Klasszikus toxikológia -Vizes expozíció-

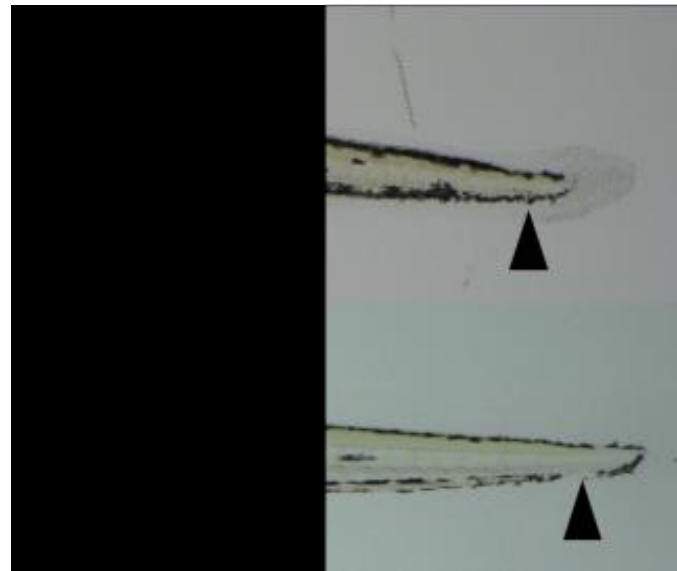


*Heart and soul fenotípus
Zearalenon (gombatoxin)*



Citosztatikumok okozta elváltozások

A szabálytalan pigmentáció az
ösztrogénhatású anyagok jellemzője

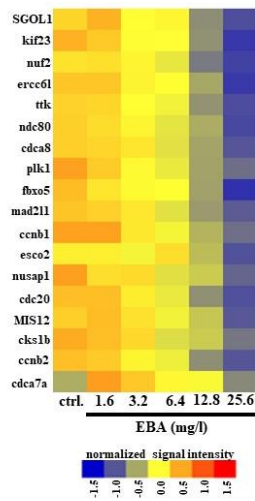
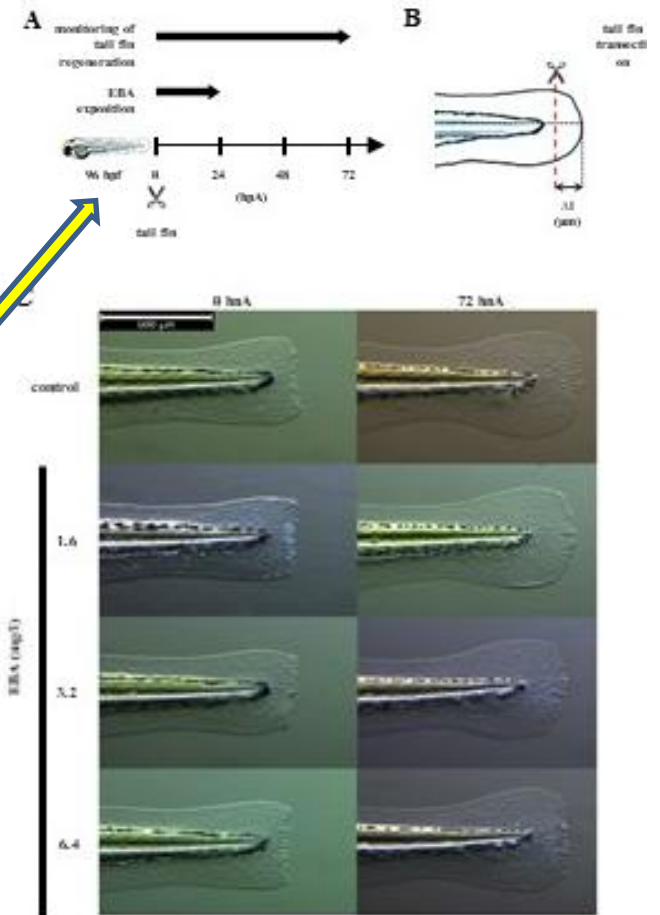


Ha nincs „fenotípus”, akkor csináljunk...

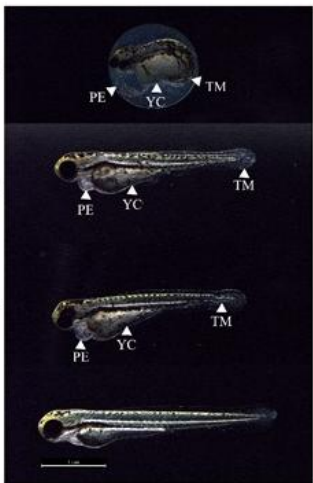
Az EBA:

- Vízisztítási melléktermék
- Ibuprofen bomlási termék
- Aromaanyag

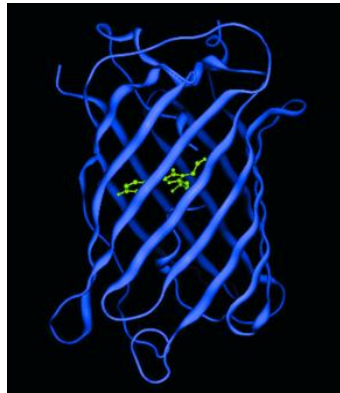
Génexpressziós változás alátámasztása fenotípusos vizsgálattal



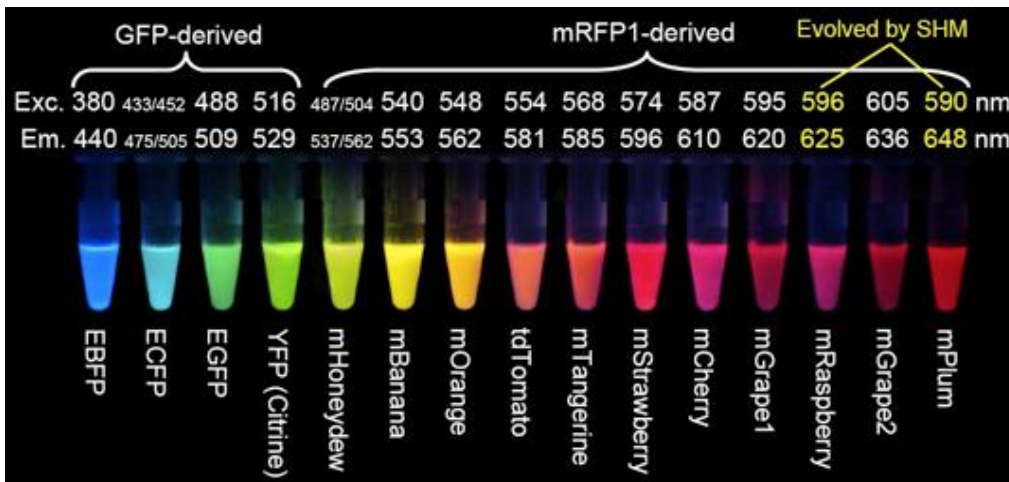
Cluster	Top 5 biological functions	p-value
Cluster 1	response to light stimulus	1,38E-06
	response to radiation	4,38E-06
	DNA repair	1,11E-05
	response to DNA damage stimulus	2,07E-05
	cellular response to stress	3,24E-05
Cluster 2	cell division	3,24E-12
	cell cycle	5,14E-10
	M phase	1,37E-07
	cell cycle phase	1,79E-07
Cluster 3	cell cycle process	1,16E-06
	response to bacterium	0,00523
	response to organic substance	0,008128
	immune response	0,014503
	cellular amino acid derivative metabolic process	0,04253
	response to inorganic substance	0,048799



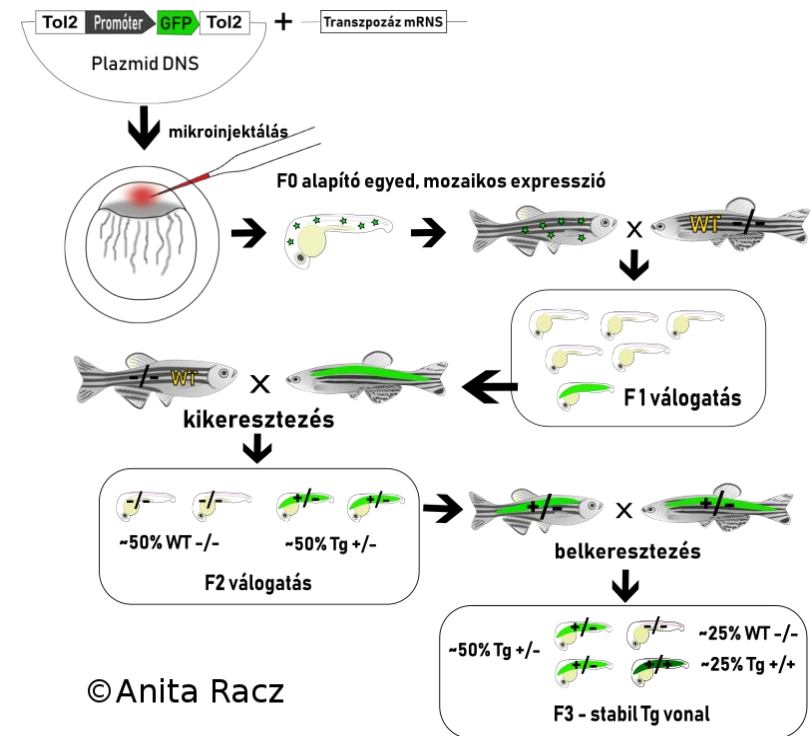
Legyen LÁTHATÓ a láthatatlan - Transzgenikus vonalak-



GFP fehérje modellje

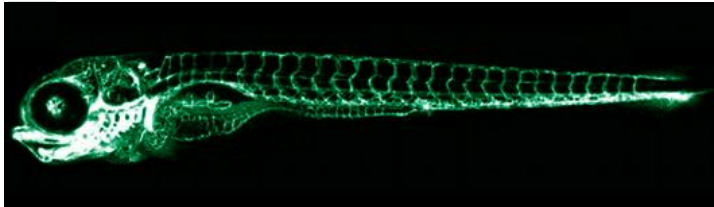


Különböző színű fluoreszcens fehérjék

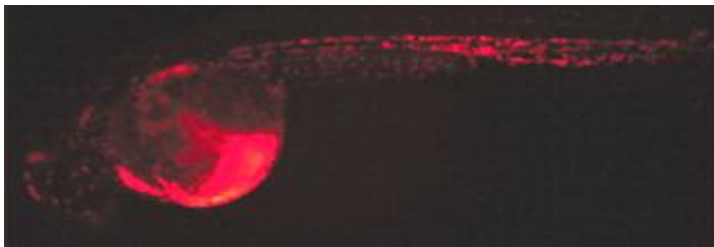


(ZIMMER 2010)

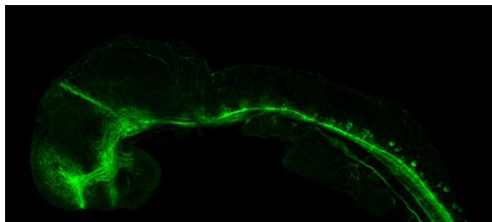
Toxikológiában „is” használatos transzgenikus zebradánió vonalak



Fli-1 (Friend leukemia integration site-1)
(GFP: green)

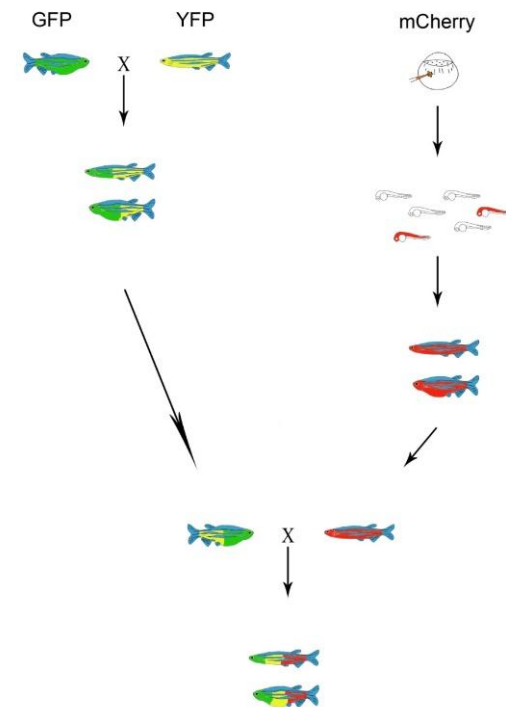


GATA-1 (globin transcription factor-1)
(DsRed, red)

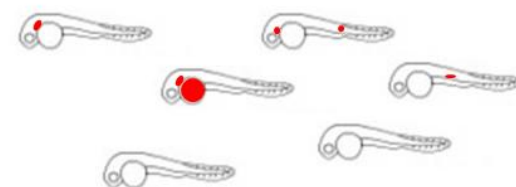
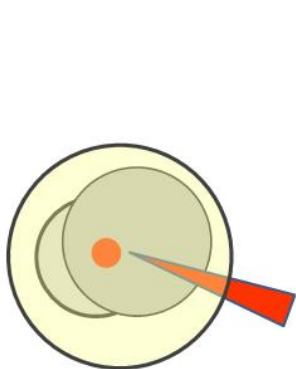
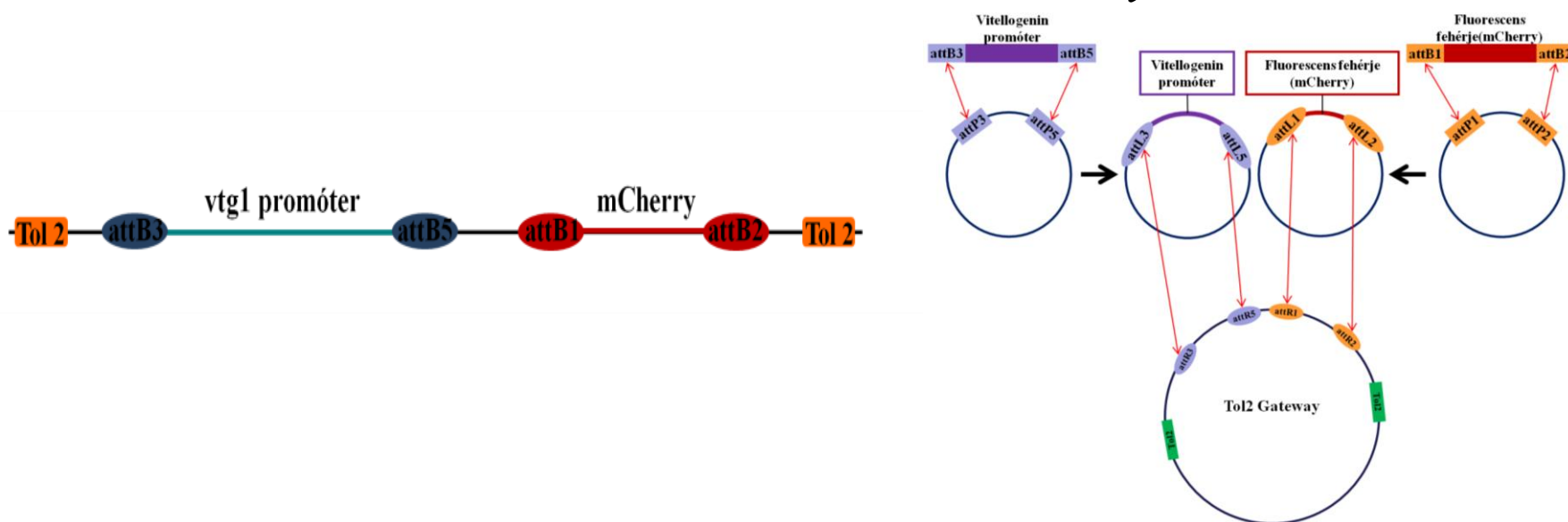


Neurogenin (GFP=Green)

Multicolor TG zebradánió vonalak - Egyedszám csökkentés!-



Biomarker vonalak létrehozása



Biomarker/bioindikátor vonalak -hatásoldalról történő vizsgálatokhoz-



Több száz molekula rendelkezik hormonháztartást megzavaró hatással

A vegyületek szerkezeti változatossága miatt különböző analitikai módszerek szükségesek a kimutatásukhoz

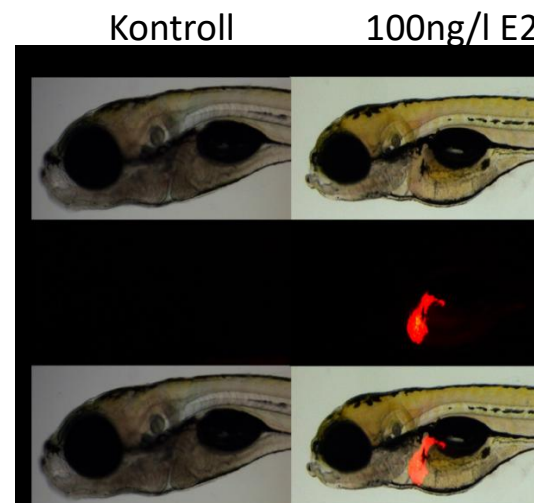
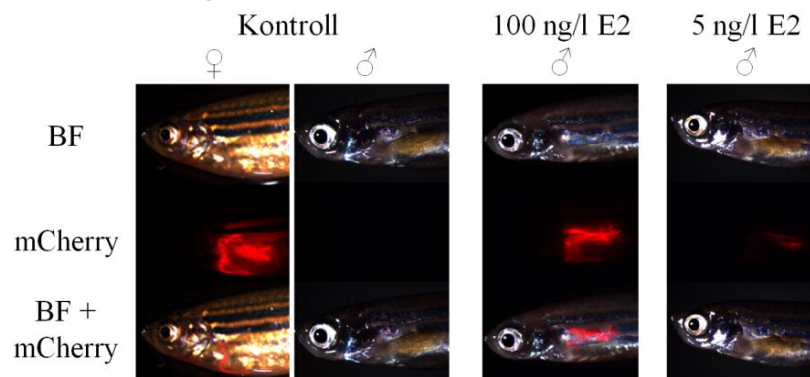
Környezeti mintákban keverékek formájában vannak jelen a vegyületek

A hatás oldalról történő megközelítés egyfajta megoldást jelenthet a problémára → *transzgenikus biomarker modellek használata*

Egy élettani folyamatot teszünk láthatóvá

Vitellogenin — ösztrogénfüggő ---- Kifejeződése májspecifikus

Tg(*vtg1: mCherry*) ösztrogén hatást kimutató transzgenikus bioszenzor zebradánió vonal



Állattartó telepek környezeti terhelése ösztrogénhatás szempontjából

Az állattartó telepeken jelentős mennyiségű trágya keletkezik, melyet szerves trágyaként szívesen használnak fel a növénytermesztésben.

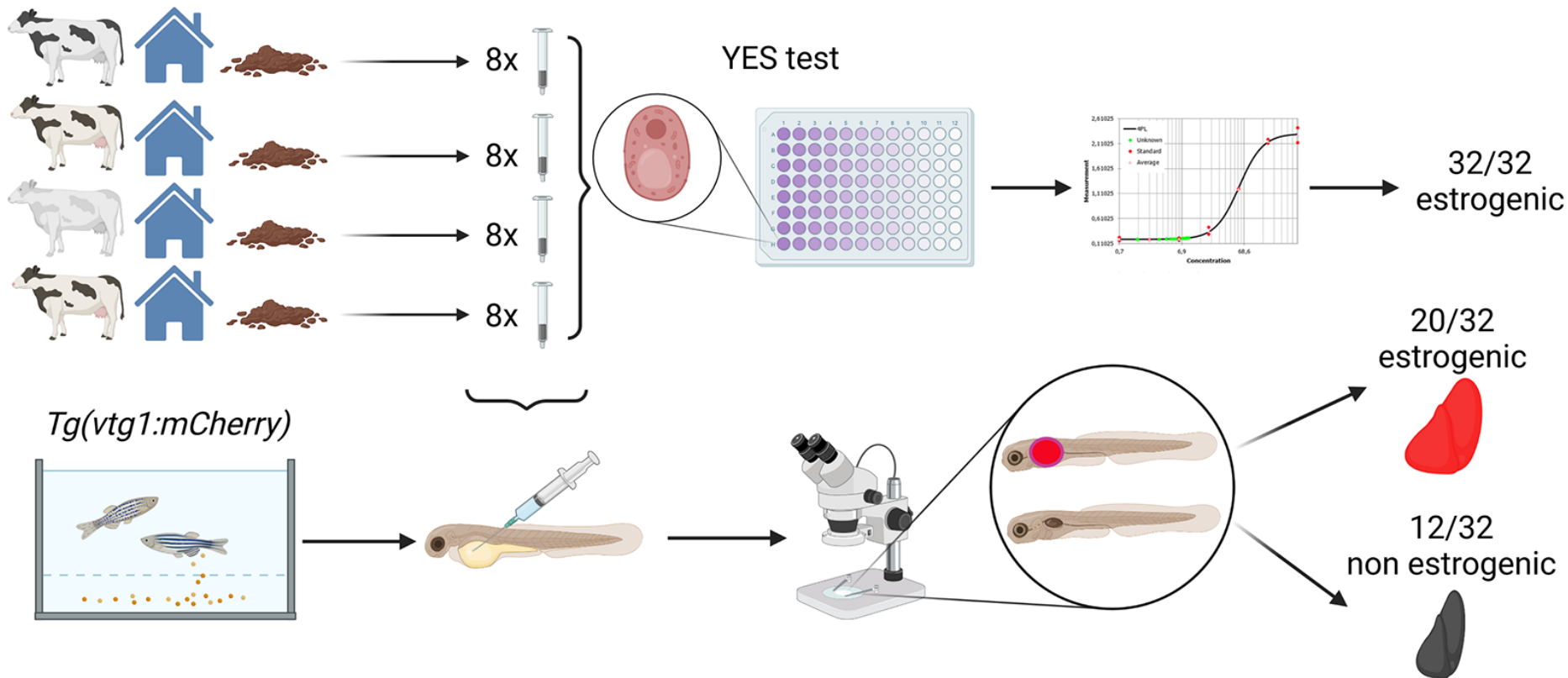
A mezőgazdasági hulladékok, például a szarvasmarha-gazdaságok trágyája, azonban a természetes és szintetikus szteroid ösztrogének és nem szteroid típusú ösztrogénvegyületeknek is a forrásai.

Egy telep ösztrogén kibocsátását (takarmányozás, életkor, állomány nagyság, vemhes állatok száma stb.), valamint az ösztrogénhatású anyagok környezeti sorsát is számos tényező befolyásolja (pl. talaj tulajdonságai, mikrobiológiai tényezők, időjárás stb.).

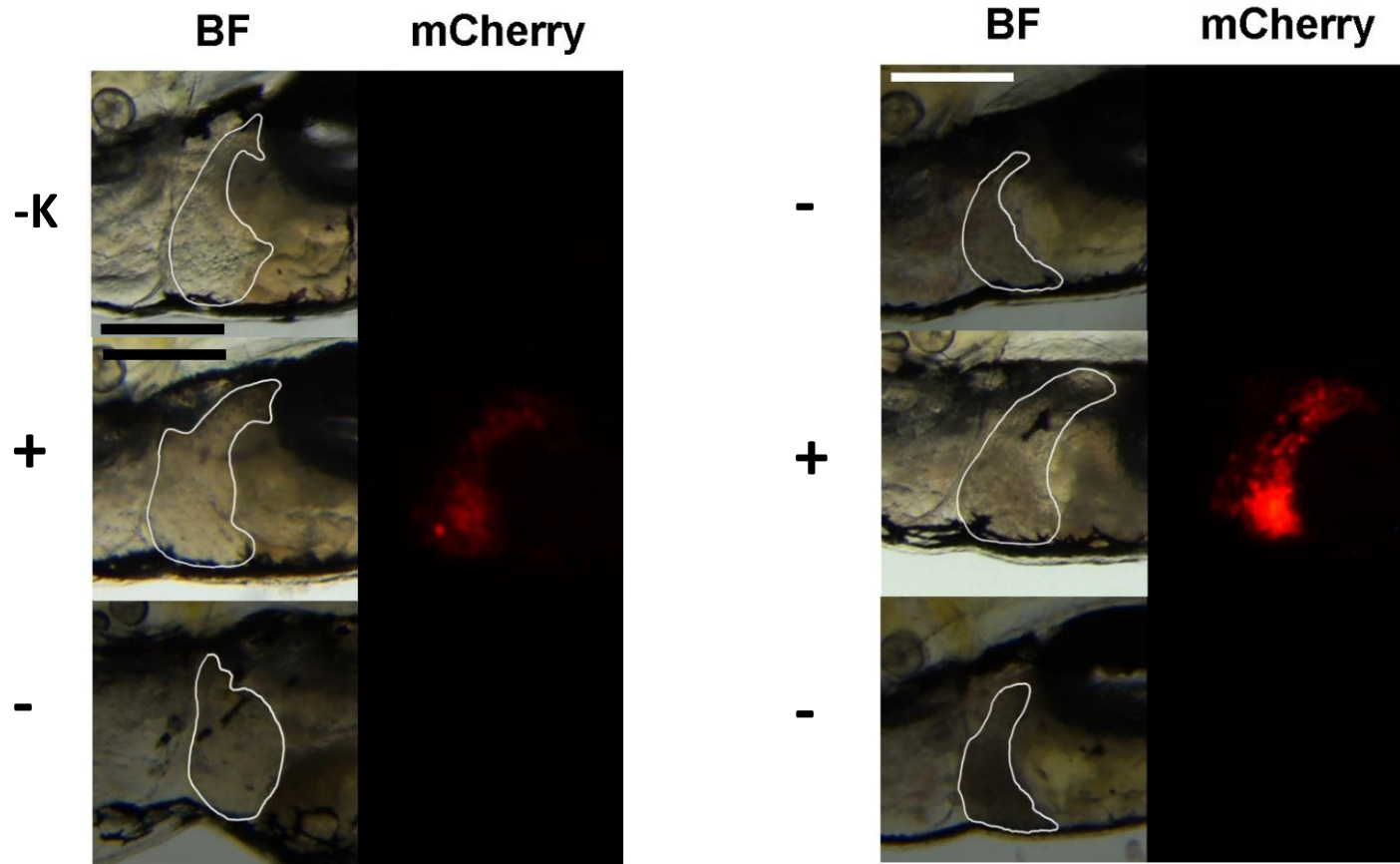
A trágyában nem csak ösztrogénhatású vegyületek találhatóak és ezek befolyásolhatják a hatásukat.

A minta magas szervesanyagtartalmú- vizes expozíció- másodlagos tünetek-

Hogyan vizsgáljuk halon? MIKROINJEKTÁLÁSSAL



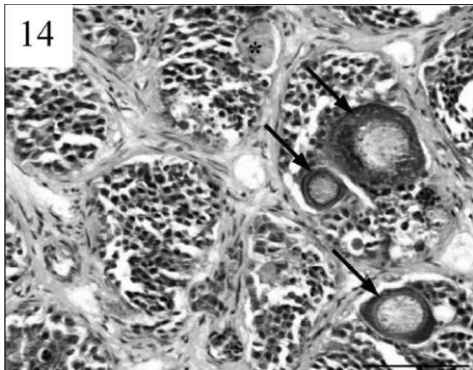
A klasszikus és a fluoreszcens megfigyelések találkozása



A minták hepatotoxikus hatása befolyással van az ösztrogénhatás kimutatására

In vivo ovotestis modell kialakítása

- Ovotestisz: here- és petefészekszövetet egyaránt tartalmazó belső nemi szerv
- Hím halaknál gyakran előfordul környezeti ösztrogénterhelés hatására
- Kimutatása szövettannal → az állat feláldozásával jár

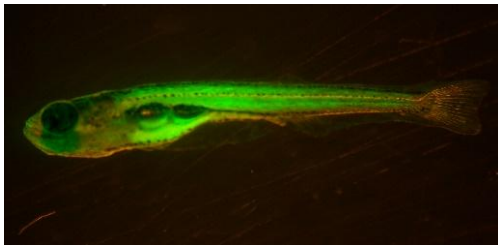


Stentiford et al. 2003

A CSILI (Chili) vonal



Casper: $\text{mitfa}^{\text{w2/w2}}$; $\text{mpv17}^{\text{a9/a9}}$

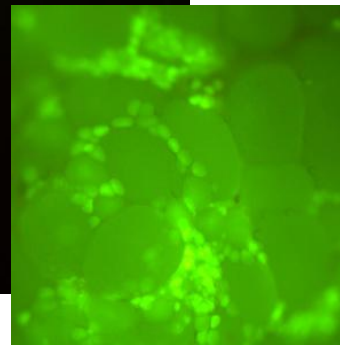
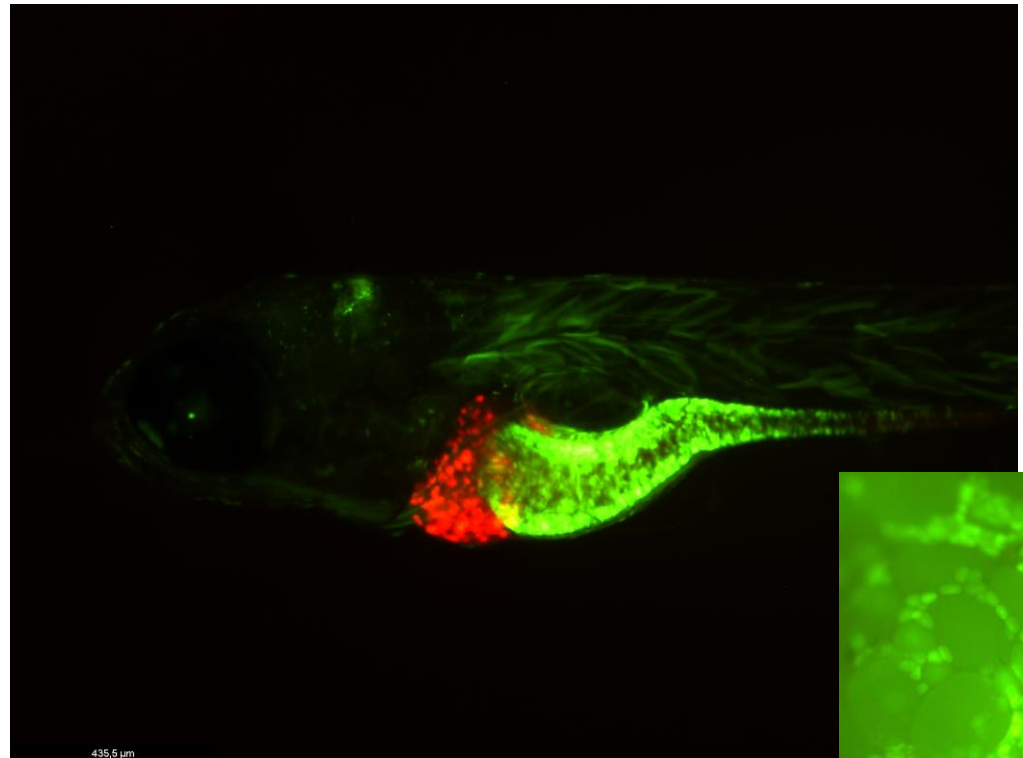


$\text{Tg}(\text{bact}:\text{YFP})$



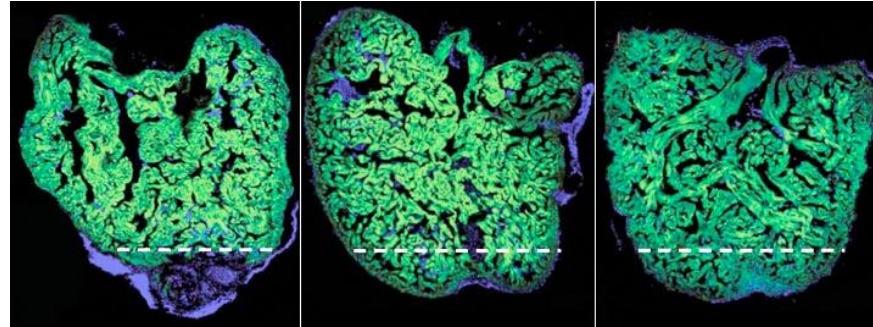
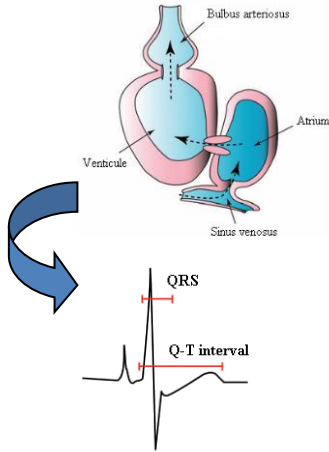
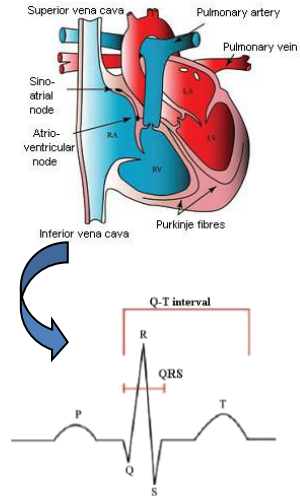
$\text{Tg}(\text{vtg1}:\text{mCherry})$

Csili= $\text{mitfa}^{\text{w2/w2}}$; $\text{mpv17}^{\text{a9/a9}}$; $\text{Tg}(\text{bact}:\text{YFP}; \text{vtg1}:\text{mCherry})$



A munka folyamatban van.

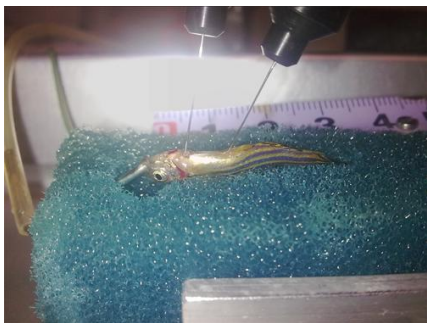
Szív- és érrendszer modellek



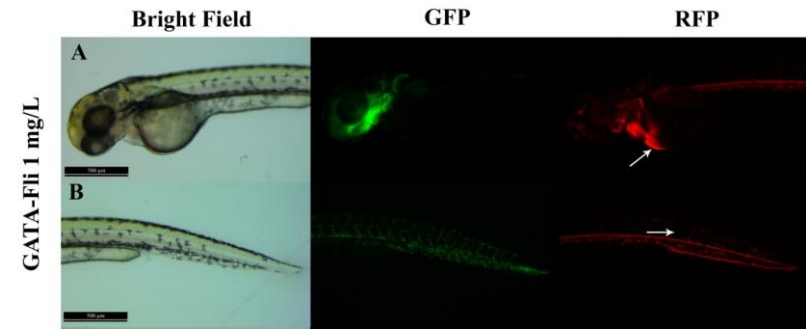
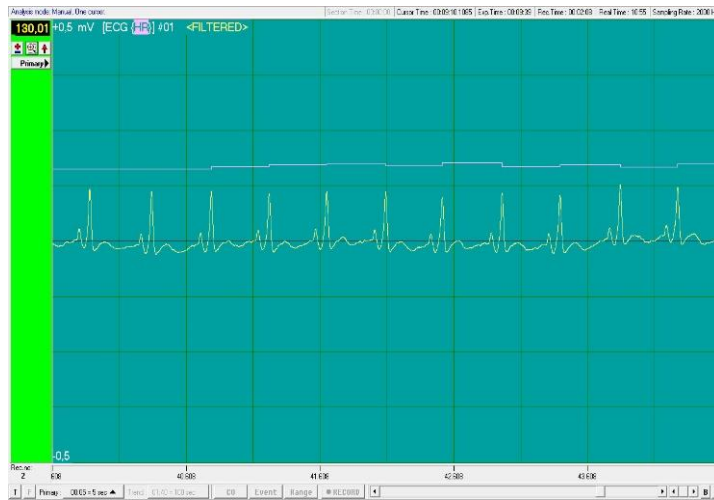
Szívszövet regeneráció
 A kamrai szívmuszat 60%-ának elölése után is regeneráció
 Embernél 20-30% már szívátültetést tesz szükségessé

(Kenneth Poss)

Leong et al. (2010)



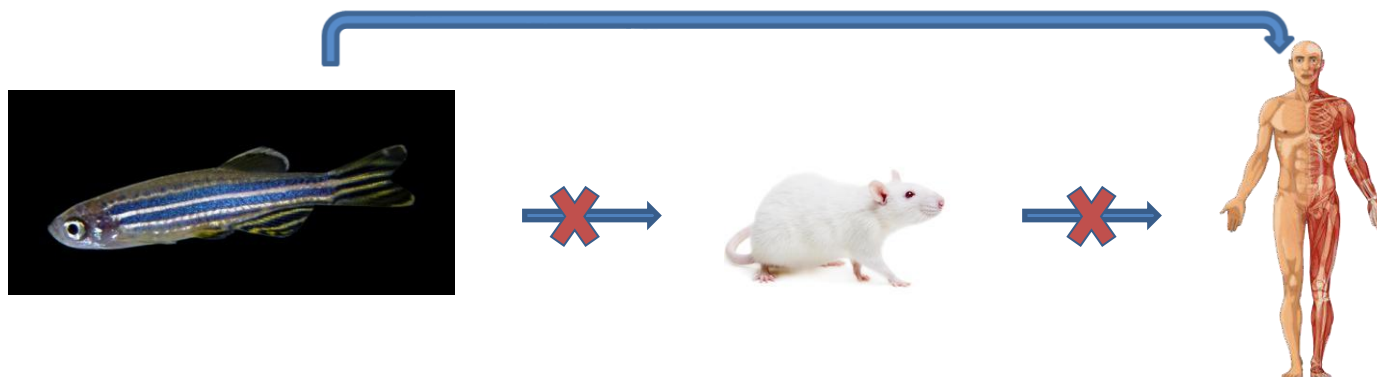
EKG mérés zebradánió



Vér és érrendszer transzgenikus vonalak

A zebradánió modell elfogadottságának növekedése

tesztelt vegyületek eredményeinek közvetlen felhasználása klinikai
tesztelésben



doi:10.1093/brain/aww342

BRAIN 2017; 140; 669–683 | 669

BRAIN
A JOURNAL OF NEUROLOGY

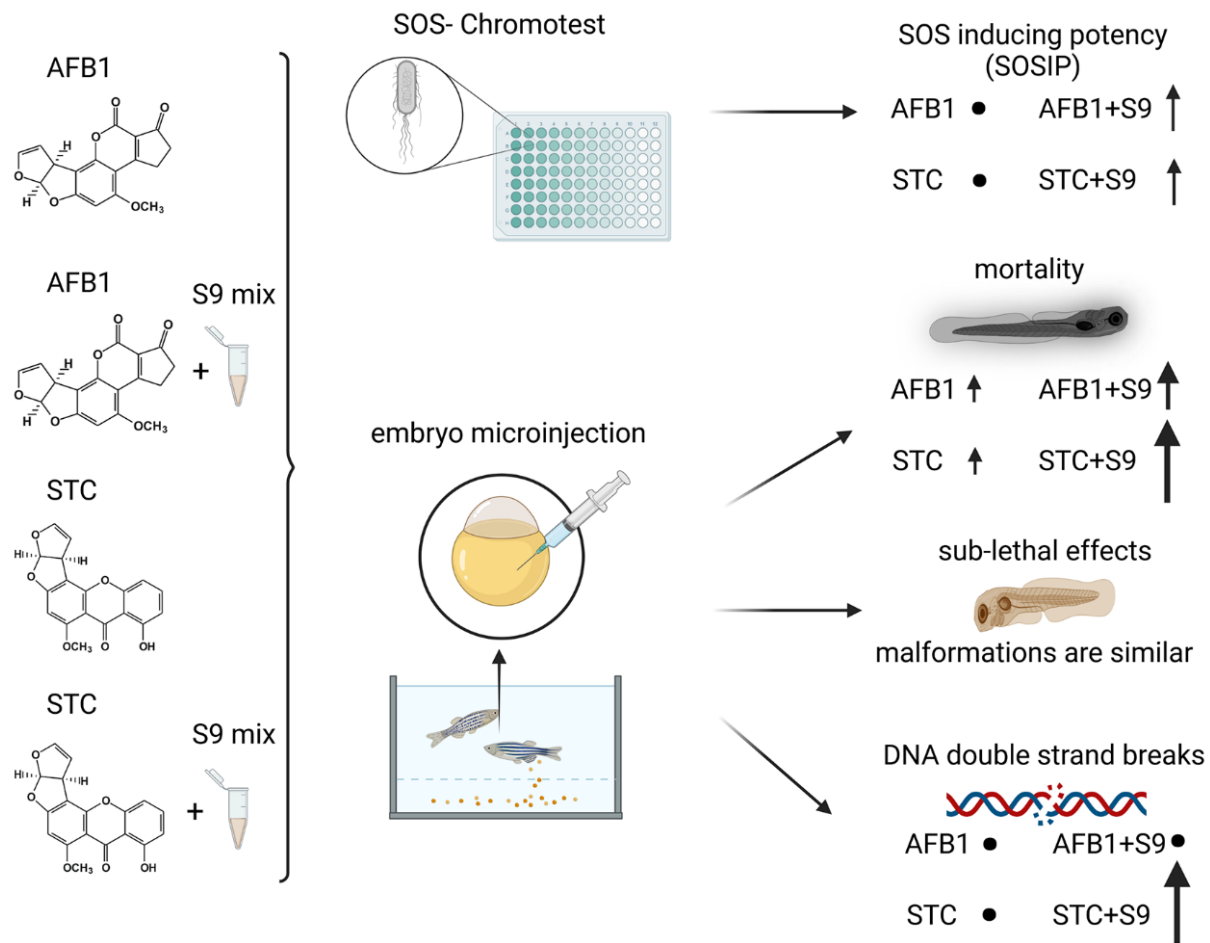
Clemizole and modulators of serotonin signalling suppress seizures in Dravet syndrome

Aliesha Griffin,¹ Kyla R. Hamling,¹ Kelly Knupp,² SoonGweon Hong,³ Luke P. Lee³ and Scott C. Baraban¹

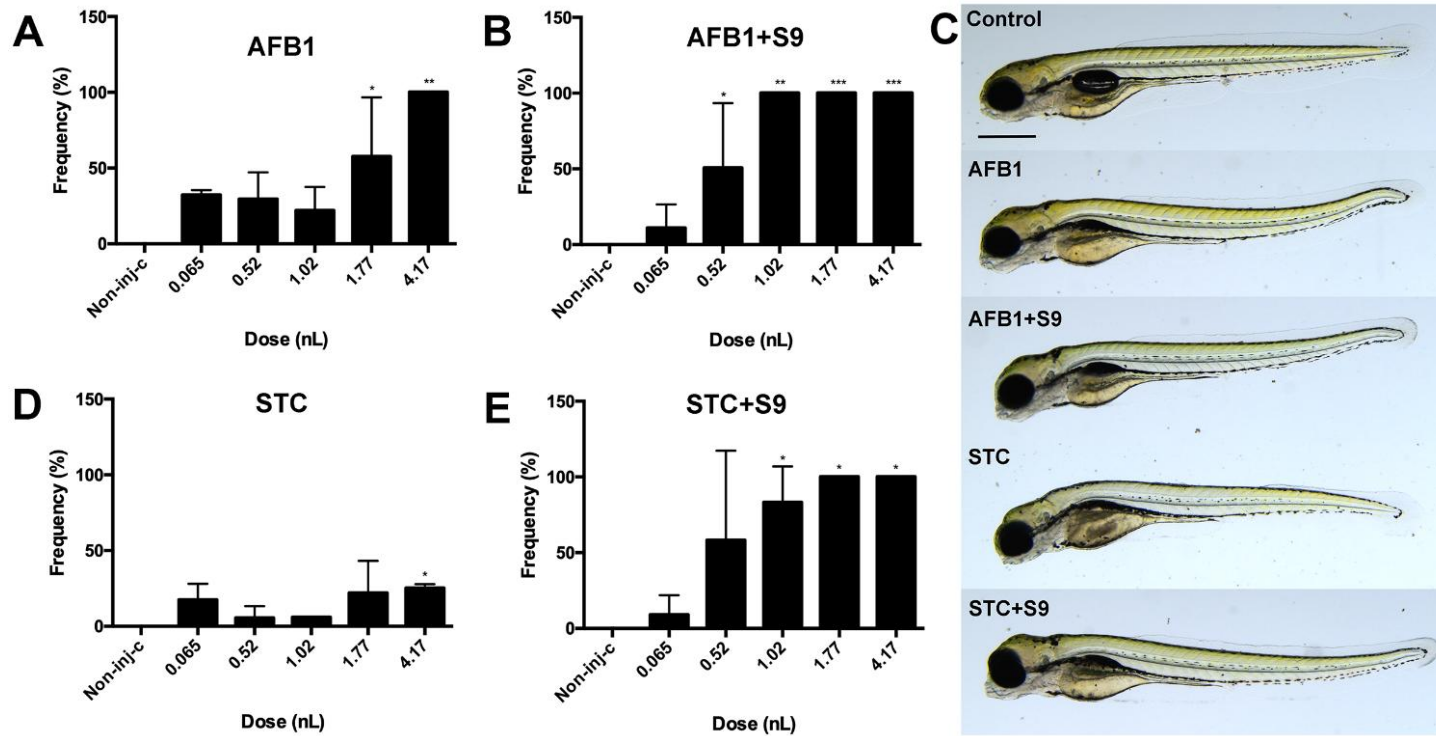
Dravet syndrome is a catastrophic childhood epilepsy with early-onset seizures, delayed language and motor development, sleep disturbances, anxiety-like behaviour, severe cognitive deficit and an increased risk of fatality. It is primarily caused by *de novo* mutations of the *SCN1A* gene encoding a neuronal voltage-activated sodium channel. Zebrafish with a mutation in the *SCN1A* homologue recapitulate spontaneous seizure activity and mimic the convulsive behavioural movements observed in Dravet syndrome. Here, we show that phenotypic screening of drug libraries in zebrafish *scn1* mutants rapidly and successfully identifies new therapeutics. We demonstrate that clemizole binds to serotonin receptors and its antiepileptic activity can be mimicked by drugs acting on serotonin signalling pathways e.g. trazodone and lorcaserin. Coincident with these zebrafish findings, we treated five medically intractable Dravet syndrome patients with a clinically-approved serotonin receptor agonist (lorcaserin, Belviq®) and observed some promising results in terms of reductions in seizure frequency and/or severity. **Our findings demonstrate a rapid path from preclinical discovery in zebrafish, through target identification, to potential clinical treatments for Dravet syndrome.**

Hozzuk közelebb egymáshoz az halembrió és az adult hal eredményeket (és ha lehet, az emlőst is...)

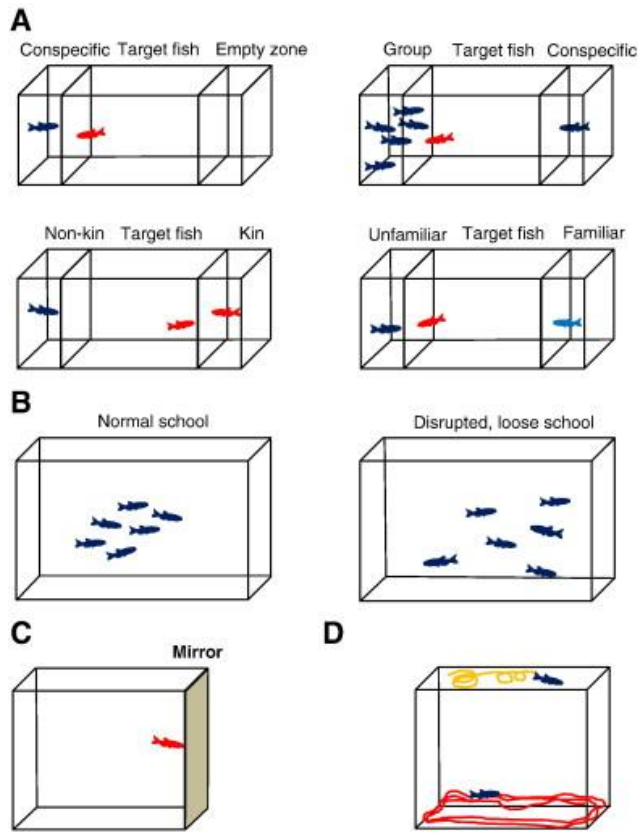
-MAS (mammalian metabolic activation system) aktivált anyagok vizsgálata-



S9 aktivált toxinok hatása halembriókon

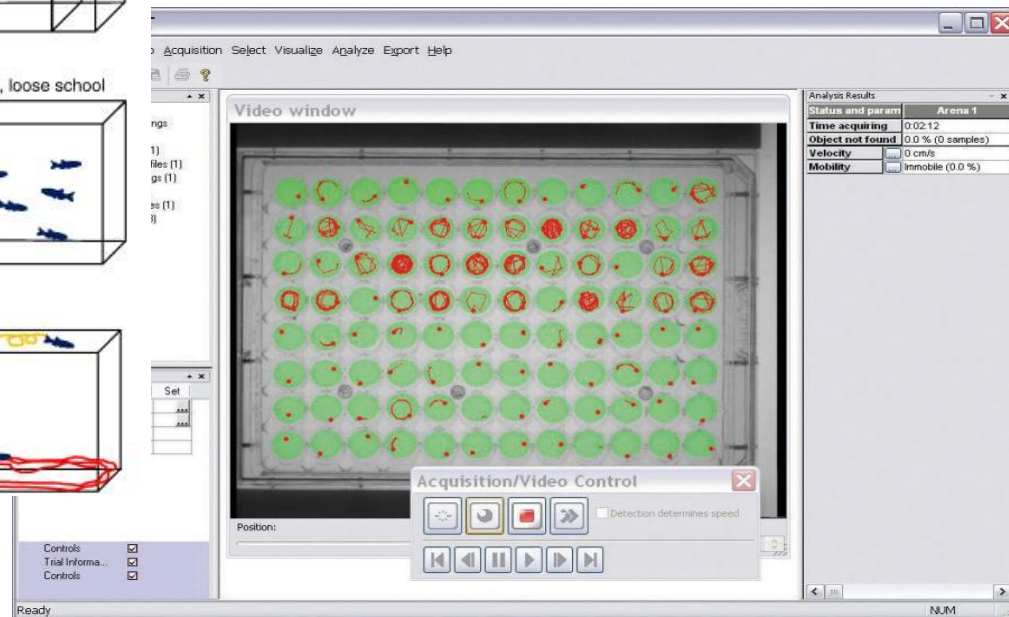


Viselkedésbiológiai- genetikai kutatások -a szociális zavarok és mentális betegségek vizsgálatához-

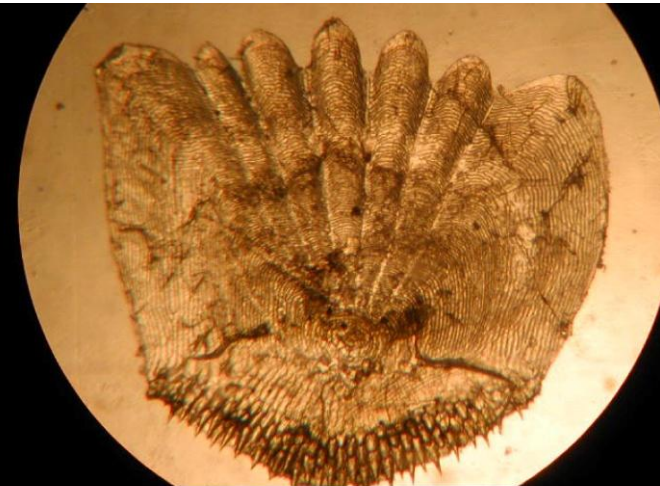


Steward et al. 2014.

-pl.:Autizmus spektrumbetegség (ASD),
poszttraumás stressz szindróma (PTSD) háttérének megismerése
- Gyógyszer hatóanyagok és egyéb vegyületek mellékhatásainak vizsgálata



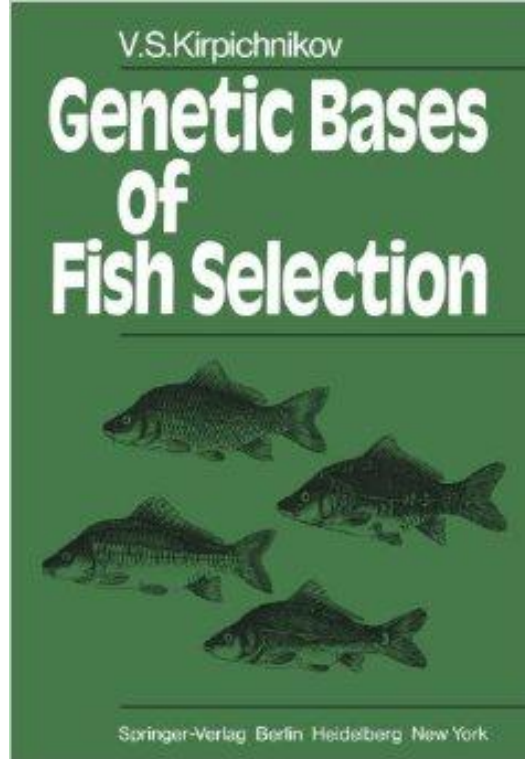
Evolúció, Kültakaró,



Bercsényi M. és mtsai 2009



Lineáris ponty: SS; Nn
Ss; Nn



Bőrpony: ss; Nn

Tükrös ponty: ss; nn



Letális: SS; NN
Ss; NN
ss; NN

Pikkelyes ponty: SS; nn
Ss; nn



Fibroblaszt növekedési faktor receptor gén (fgfr1)
- asszem felesleges volt Kirpichnikov dogmáját megtanulnom-



Rohner et al. 2008

Bercsényi M. és mtsai 2009

Fogas (hajás) problémák

