

Víztisztítási reakció-melléktermékek toxikus, mutagén és karcinogén hatásának vizsgálata *in vitro* és *in vivo* rendszereken

Doktori tézisek

Dr. Rác Gergely István

Semmelweis Egyetem
Patológiai tudományok Doktori Iskola



Konzulens: Dr. Szende Béla D.Sc., professor emeritus

Hivatalos bírálók: Dr. Sótonyi Péter Tamás D.Sc., egyetemi tanár
Dr. Glasz Tibor Ph.D., egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Cseh Károly D.Sc., egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Kéry Ágnes Ph.D., egyetemi docens
Dr. Tóth Erika Ph.D., főorvos

**Budapest
2014**

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	2
BEVEZETÉS.....	3
CÉLKITŰZÉSEK.....	4
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	5
EREDMÉNYEK.....	9
AZ EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE.....	12
KÖVETKEZTETÉSEK	16
ÖSSZEFOGLALÁS	17
SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE	18

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ASV: Air saturation volume

EBA: 4-ethylbenzaldehyd

EPA: Environmental Protection Agency – Környezetvédelmi Hivatal, USA

CDBP: Concentrate of Disinfection Byproducts

CSRW: Concentrate of Sediment of Raw Water

DBP: Disinfection byproduct – víztisztítási melléktermék

DFA: 2,4-difluoroanilin

DOM: Dissolved Organic Matter – Oldott Szerves Anyag

GC-MS: Gázkromatográfiás elválasztással kombinált tömegspektrometria

HAA: Haloacetic acid (Haloecetsav)

HE: Hematoxin-Eosin

IARC: International Agency for Research on Cancer (Nemzetközi Rákkutató Hivatal)

NOM: Natural Organic Matter – a vízben természetesen előforduló szerves anyagok

PAS: Periodic Acid-Schiff

PBS: Phosphate buffered saline

THM: Trihalometán

WHO: World Health Organization – Egészségügyi Világszervezet

BEVEZETÉS

Az ivóvíz az emberi szervezet számára nélkülözhetetlen. A különböző szennyezések és szennyezőanyagok, valamint különösen az emberi tevékenység miatt létrejövő szennyezések következtében a természetben található vizek jelentős része közvetlen emberi fogyasztásra alkalmatlan. Ezért a fertőtlenítés alapvetően fontos az ivóvíz okozta és közvetítette ártalmak megelőzésében. Az ivóvíz patogén mikrobákkal történő szennyeződése (kontaminációja) alapvetően hozzájárul a fertőző betegségek terjedéséhez. A víz ezen vektorjellegének megszüntetéséhez az egyik leggyakrabban alkalmazott specifikus eljárás az ivóvíz fertőtlenítése. Jóminőségű, emberi fogyasztásra alkalmas ivóvíz előállításához megfelelő felszíni nyersvíz-forrást kell használni, amelyet aztán további kezelésnek kell alávetni. A víztisztítás számos lépést tartalmaz. A nyersvíz szűrését követi a koaguláció- flokkuláció (derítés), az üleptetés, szűrés és végül a víz különböző módon történő fertőtlenítése, majd az ivóvíz vagy átmeneti tározókba vagy közvetlenül az elosztó rendszerbe kerül. A víztisztítás viszonylag rövid története során ezek a lépések valamelyest finomodtak az alapvető cél azonban nem változott: biztonságosan fogyasztható tiszta ivóvíz előállítása.

Az ivóvízben kialakuló fertőtlenítési melléktermékek – disinfection byproducts - DBP-k-nek felfedezésük óta különös figyelmet szentelnek a toxikológusok és a járványügyi szakemberek. Különösen az ivóvízben egyre gyakrabban előforduló ún. „high-priority” DBP-k okoznak egyre több aggodalmat, hiszen keveset tudunk ezen vegyületek egészségügyi kockázatairól és lehetséges egészségügyi hatásairól.

Egy fontos dolog mindenképpen kijelenthető: a víz fertőtlenítése során valamilyen kompromisszum elengedhetetlen, hiszen a szennyvíz tisztítása során mindig keletkeznek tisztítási melléktermékek, melyek károsak ugyan, de ez még mindig kisebb veszéllyel jár, mint ha nem pusztítjuk el a vízben élő kórokozókat. Vizsgálatainknak célja az volt, hogy megállapítsuk, van-e a magyarországi ivóvíz-mintákban található fertőtlenítési reakciómelléktermékeknek toxikus, mutagén vagy karcinogén hatása. Vajon tényleg jó kompromisszumokat kötünk a vízkezelés során? Értekezésemben többek között erre is kerestem a választ.

CÉLKITŰZÉSEK

Szakirodalmi adatok tükrében fontosnak tartottuk, hogy hazai körülmények között is vizsgálat tárgyává tegyük:

- a víztisztítás során keletkezett reakció melléktermékek jelenlétét ivóvízben
- a reakció melléktermék-komplex esetleges mutagén hatását Ames-teszt alkalmazásával
- a reakció melléktermék-komplex esetleges programozott sejthalált-apoptózist-kiváltó hatását, humán lymphocyták alkalmazásával
- a reakció melléktermék-komplex kémiai összetételét
- a kémiai szerkezet alapján kiválasztott vegyületek feltételezett apoptózist fokozó hatását
- a kémiai szerkezet alapján kiválasztott vegyületek *in vivotoxicus* vagy carcinogén vizsgálatát kísérleti akváriumi halak alkalmazásával.

A vizsgálatokat részben a Semmelweis Egyetemen belül az I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet és a Közegészségtani Intézet közötti kollaborációval, az Európai Közösség INCO COPERNICUS-Community Research project keretében végeztük (Biotechnological procedures for sustainable water management, No. ERBIC 15 CT 980129-PL971185), részben a Szent István Egyetemen belül a Patológiai Tanszékkal és a Halgazdálkodási Tanszékkal történő kollaborációval végeztük. Az analitikai vizsgálatok a BÁLINT ANALITIKAMérnöki Kutató és Szolgáltató Kft. kémiai laboratóriumában történtek.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A vízminták a Fővárosi Vízművek Csepeli Vízkezelőművekdunaparti csápos kútjából származtak. Egy mintavétel során összesen 600-800litert vízmintát vettünk. A vízminta klór tartalmát a Magyar Vízszabvány MSZ 448/25-81 DPD fotometriás módszerével ellenőriztük. A vízminták ózon tartalmát jodometriásan ellenőriztük, a Fővárosi Vízművek RT. Minőségügyi Kézikönyve alapján. A vízminta szerves széntartalmának ellenőrzése: LAB TOC 2100 készüléken történt.

A vízminták ismeretlen szerves mikroszennyezőinek azonosítása

A módszer lényege, hogy a kiválasztott vízmintákat speciális adszorbensen folytatjuk át, amelyek különböző módokon megkötik a nyersvízben meglévő és a vízkezelés során keletkező szerves mikroszennyezőket. A gyanta fehér, gyöngy alakú, hidrofób, apoláros, nemionos, következésképpen az apoláros, nemionos, semleges szerves vegyületeket adszorbeálja, a poláros, ionos szerves vegyületeket kevésbé köti meg. A makroretikuláris XAD gyantaoszlopokon ezek a vegyületek hatékonyabban adszorbeálódnak. A gyantán túlsúlyban adszorpcióval dúsulnak a szerves vegyületek, míg kemisorpcióval gyakorlatilag nem kötődnek meg, ezért az adszorbeált vegyületeket jó határfokkal deszorbeálhattuk.

A vízminták ismeretlen szerves szennyezőinek azonosítása GC-MS módszerrel

A gázkromatográfiás elválasztással kombinált tömegspektrometria (GC-MS)alkalmas felszíni, felszín alatti, ivóvíz és szennyvíz ismeretlen szerves szennyezőinek jellemzésére, minőségi azonosítására.

Gázkromatográfiás vizsgálati körülmények

VizsgálatainkozHP 5890 típusú gázkromatográfot használtunk tömegspektrométerrel vagy tömegszelektív detektorral a következő beállításokkal: Injektor 250 °C, splitless idő: 1 perc Vivőgáz: hélium T5.5, fejnyomás 70 kPa; Kolonna: kémiaiilag kötött fázisú 100 metil-szilikon [HP-ultra 1] hossza 25 m, belső átmérője 0.2 mm, filmvastagság 0.50 µm; Detektor: tömegspektrométer (MS) vagy tömegszelektív detektor (MSD) SCAN üzemmód.A mérés megkezdése előtt a tömegspektrométert úgynevezett automatikus hangolással állítjuk be a SCAN módszerhez, majd a mintából és a vakból1 µl-t injektálunk a gázkromatográfba, és felvesszük a minta és a vakpróba tömegspektrumát.

A vizsgálati eredmények értékelése

A vízmintákban és a vak-próbában lévő szerves anyagok minőségi azonosítását tömegspektrumaik WILEY 138 spektrum könyvtárral való összehasonlításával végeztük. Ha a vakpróba szokatlanul szennyezett, az előkészítési folyamatot lépésről lépésre ellenőrizni kell újabb vakpróbák készítésével, hogy a vak szennyezettségének okát kiderítsük és kiküszöböljük. A módszer kimutatási határa kb. 1-10 µg/L a vegyület minőségétől és a zavaró hatásoktól függően. A GC/MS nem csak érzékeny módszer, de az anyagok egyértelmű beazonosítására is lehetőséget ad.

Genotoxicitásvizsgálatok

Ames-teszt

A vizsgálati rendszer lehetőséget nyújt a pontmutációk, azaz a deléciók, szubsztitúciók, bázispárcserét okozó és a frameshiftmutagének elkülönítésére, továbbá a metabolikus aktivációt nem igénylő direkt mutagének, és a nagyobb számú, metabolikus aktivációt igénylő indirekt mutagének elkülönítésére is

A teszt alapja, hogy az alkalmazott *Salmonella typhimurium* baktérium törzs egy defekt, mutált gént tartalmaz a genomjában, ami alkalmatlanná teszi arra, hogy a médiumból, amiben tenyészik, hisztidint (His) állítson elő. Abban az esetben, ha valami hatás következtében újabb mutáció során ez a gén visszanyeri eredeti, funkcionáló alakját, a revertáns baktériumok His-mentes táptalajon is képesek lesznek szaporodni. Ezek, az ún. hisztidin-auxotróftörzsek mutáció hatására tehát visszanyerik a hisztidin-mentes környezetbeni szaporodó-képességüket, így hisztidin-mentes agaron a *Salmonella* telepek megjelenése mutagén anyag jelenlétét jelzi. Ezen modellrendszerben tesztelt vegyi anyagok pozitív eredmény esetén még nem biztos, hogy emlős sejteken is mutagének bizonyulnak, a relevancia 80% körüli.

Számos anyag eredeti formájában nem mutagén (vagy karcinogén), de a szervezetben történő metabolizációjuk során keletkezhetnek belőlük aktív, egészségre káros formák. Miután a *S. typhimurium* prokarióta, benne ez a metabolizáció természetesen nem játszódhat le. Ezt a problémát oldja meg a kísérletben alkalmazott S9 mix, ami patkánymáj kivonat és az eukarióta májban fellelhető enzimrendszereket helyettesíti. A teszthez különböző jelzésű *Salmonella* törzseket használhatunk (pl. TA98, TA100), amik egymástól abban különböznek, hogy milyen típusú mutáció detektálására a legérzékenyebbek. A teszt értékelése a revertáns klónok telepeinek összeszámlálásából és statisztikai elemzéséből áll.

A teszteléshez olyan tesztörzseket alkalmazunk, melyek hisztidin-operonja többféle változtatást hordoz emiatt ezek a törzsek nem képesek hisztidin szintézisére újabb mutáció vagyis reverz-mutáció nélkül. A reverz mutáció, és a mutációk általában kétféleképpen jöhetnek létre: spontán módon és vegyszerek által indukáltan. A teszt az indukált mutációs hatások mérésére szolgál.

Apoptózis vizsgálat

A sejtszervek működését szabályozó egyik legfontosabb mechanizmus a program szerinti sejthalál, az apoptózis. Ez távolítja el a feleslegessé vált vagy a károsodott sejteket, megakadályozva többek között azt, hogy a genetikai állományokban hibát hordozó sejtek szaporodjanak. Minden olyan tényező, amely az apoptózis ellen hat, potenciálisan a daganatkeletkezést elősegítőnek tekinthető, hiszen a sejthalál elmaradásával megnő az esélye annak, hogy a sejtek génhibáikkal együtt felhalmozódjanak. Vizsgálatainkat perifériás lymphocytákon végeztük, melyeket három, nemdohányzó 25-32 év közötti egészséges felnőtt férfiből nyertük venipunktúrával, K-citrát tartalmú fiolák segítségével; a kinyert vér egy órán belül felhasználásra került. A mononucleáris sejteket Boyum által leírt módszer szerint szeparáltuk.

Flow-citometria

A kísérletek végén a lymphocytákat $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os 70%-os etanolban fixáltuk 24^{h} órán keresztül. A lymphocytákon végzett Flow citometria (DNS tartalom meghatározás) FACScan flow cytométerrel történt (Becton-Dickinson, Mountain View, CA, USA), Macintosh Quadra computer és Cellquest adatelemző software felhasználásával. Az apoptotikus sejtek számát és a sejtciklus vizsgálatát Modifit software segítségével végeztük. A sejtek szuszpenzálását Schuleret al. szerint végeztük. Röviden, az etanol fixálás után az internukleoszómáisan fragmentált DNS-t eltávolítottuk az apoptotikus sejtekből RNázal kiegészített citrát pufferben ($\text{pH}=7.8$), majd a DNS tartalmat flow-cytometriával határoztuk meg. Minden koncentráció esetén a kontroll és három kísérleti minta került mérésre.

Comet-teszt

Lényegileg sejszintű elektroforetikus vizsgálat egyes és kettős szálú DNS-törések identifikálására. Első lépésként a kezelt lymphocytákat is tartalmazó sejteket centrifugával besűrítettük, majd agarózba (Sigma-Aldrich, Magyarország) szuszpendálva „szendvicsbe” ágyaztuk. Fontos az agaróz sűrűségének megfelelő beállítása, hogy benne, miután megszilárdult, az apoptózisra jellemző 2-300kbp-nyi fragmentek, amik a jellegzetes apoptotikus létrát is adják, az elektroforézis során vándorolni tudjanak, de a nagyobb DNS darabok, amik apoptózisra nem patognomikusak, méretüknél fogva ne tudjanak beágyazott helyükről elmozdulni. (Ajánlásokat követve 0,5%-os LMP agarózt használtunk.) A sejtmembrán lizálására azért van szükség, mert apoptózis során a mb-ok intaktak maradnak, szemben a nekrozissal. A lizáláshoz az oldat tritont tartalmaz (NaCl, EDTA, Tris, DMSO, Triton), a folyamat 4°C -on, sötét helyen, 1órán át tart. Az elektroforézis 15percig, 300mA-rel, 25V-on történik. Ezután történik a festés EtBr-dal, majd a fluorescensvagy confocalismikroszkópos értékelés. A jellegzetes apoptotikus sejt leginkább egy üstököshöz hasonlítható, melynek csóvjája tartalmazza a megfestett, fluoreszkáló DNS-fragmenteket.

Akut toxicitás vizsgálat Zebra danioaquariumi halak felhasználásával

Az LC_{50} értékét az OECD iránymutatásoknak megfelelően határoztuk meg, amely a halakra vonatkozó akut toxicitási tesztek leírását tartalmazza. Az általunk vizsgált két anyag az EBA(4-etil denzaldehyd) és a DFA (2,4-difluoroanilin) előzetes gázkromatográfiás vizsgálatok alapján került kiválasztásra. A törzsoldat 1000 mg/l volt. Semi-státikus tesztként az oldatokat 48 óránként cseréltük. A halakat 96 órán keresztül inkubáltuk az adott vizsgálandó anyagban. Az elpusztult állatokat a 96 óra leteltével számoltuk, és meghatároztuk azt a koncentrációt, amely éppen a halak 50%-át pusztította el (LC_{50}). Az esetlegesen előforduló és megfigyelhető látható elváltozásokat feljegyeztük (e.g. egyensúlyvesztés, úszási viselkedés, légzőfunkciók épsége, pigmentáció, stb.). A pH, az oldott oxigén és hőmérsékleti értékeket naponta mértük.

A zebra daniók kezelése és szövettani vizsgálata

A haltenyészeteket egymástól függetlenül kezeltük minden hatóanyag két különböző koncentrációjával, dupla csoportokban. A kísérletekben alkalmazott oldatkonzentrációk a következők voltak: 2.5 mg/l és 5 mg/l EBA ill. 5 mg/l és 10 mg/l DFA. Az alkalmazott koncentrációkat *in situ* alkalmaztuk, a korábban meghatározott

szubakut LC10 érték alatt (ld. LC50 meghatározás). A kontroll csoportokat – szintén dupla csoportokban – EBA és DFA mentes médiumban tartottuk. Minden kísérleti és kontroll csoportban 25 felnőtt hal volt, nemre tekintet nélkül, a halak denzitása a tartóedényben pedig 0.4-0.5 g/l volt.

A halakat 4%-os, PBS-ben oldott paraformaldehid oldatban fixáltuk 24-48 órán keresztül, majd PBS mosást követően felszálló alkohol sorban és xilolban dehidráltuk, végül paraffinba ágyasztuk. A halakat sagittalis síkban elvágtuk a középvonaltól kissé laterálisan, majd minkét halrészről 4–6 µm vastag metszeteket készítettünk. Az így készült metszeten a szöveti alkotóelemeket klasszikus Hematoxilin-Eozin (HE) ill. Kongóvörös (CR) festéssel, vagy PAS-reakcióval (PeriodicAcid-Schiff) vizualizáltuk.

A víztisztítási melléktermékek okozta zsíros májkárosodás kvantitatív vizsgálata digitális mikroszkópiával

A két vizsgált DBP molekula, az EBA és DFA májra gyakorolt hatását digitális mikroszkópiával vizsgáltuk. Röviden, automata képanalízist alkalmaztunk a hepatocytákban végbemenő zsíros degradáció meghatározásához és kvantifikációjához (ld.). Mindegyik DBP esetében két koncentrációt alkalmaztunk (2.5 és 5 mg/l az EBA esetében és 5 ill. 10 mg/l DFA esetében). A hematoxilin-eozin festéssel készült zebadánió-máj metszeteiről digitális (optikai) metszettelvételeket készítettünk. Az értekezésben bemutatott vizsgálatokat a 3DHISTECH által kifejlesztett PANNORAMIC rendszerrel végeztük. . Mindkét koncentráció alkalmazása során két-két csoport halat vizsgáltunk az adott kísérleteknél jelzett időtartamig. A kontroll csoportba tartozó halakat EBA és DFA mentes médiumban tartottuk. A mintaként kiválasztott halak májából véletlenszerűen választottunk ki területeket, melyeket a megfelelő szövettani előkészítés után 450x-es nagyításon vizsgáltunk, a szövettani képet digitálisan rögzítettük, majd a nem-festett lipid-cseppek által elfoglalt területeket – szintén digitális képanalízist követően – kvantifikáltuk a hepatocytákban.

EREDMÉNYEK

In vitro vizsgálatok I.: Kezeletlen vízminta mutagén aktivitása

A kezeletlen kútvíz a TA-98 teszter törzs esetén a Serdolit PAD III. gyantaoszlopon történt koncentrálassal aktiválás nélkül, ill. aktiválással sem mutagén. A TA-100 teszter törzsnél azonban aktiválással mutagenitás mutatható ki. A revertáns baktériumszám és a vízminta adag között lineáris regressziós összefüggés, igen szoros korreláció van. A vízminták a pozitív mutagén aktivitás kritériumait kielégítik. A kezeletlen kútvíz a TA-98 teszter törzsben Amberlite XAD-2 gyantaoszlopon történő koncentrállás után mutagén mind aktiválás nélkül, mind aktiválással, szemben a Serdolit PAD III. gyantaoszlopon történt koncentrálassal, ahol sem aktiválás nélkül, sem aktiválással nem mutatkozott mutagén hatás.

A TA-100 teszter törzsben a vízminta azonban csak aktiválást követően indukált mutagenitást, mind Amberlite XAD-2, mind Serdolit PAD III. gyantaoszlopokon történt koncentrállást követően. A vízminta adag és a revertáns mutagén baktériumszám között lineáris regresszió, igen szoros korreláció van. A vízminták a pozitív mutagén aktivitás feltételeinek megfelelnek.

In vitro vizsgálatok II. A kezelt vízminta mutagén aktivitása

A kezelt kútvíz a TA-98 teszter törzsnél a Serdolit PAD III. gyantaoszlopon történt koncentrállást követően aktiválás nélkül, és aktiválás után nem mutatott mutagén aktivitást. Ugyanakkor az Amberlite XAD-2 gyantaoszlopon történt koncentrállás után aktiválás nélkül és aktiválás után is mutagén hatást észleltünk.

A TA-100 teszt törzs esetében a Serdolit PAD III. gyantaoszlopon történt koncentrállást követően a vízminta extrakció utána csak aktiválással váltott ki pozitív mutagén hatást. Amberlite XAD-2 gyantaoszlopon történt koncentrállás után a minta mind aktiválással, mind aktiválás nélkül mutagén hatással rendelkezett. Mindezek alapján a kezelt vízmintákból származó víztisztítási reakciótermékek az általunk vizsgált víz esetében mutagénnek bizonyultak.

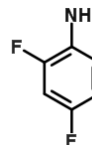
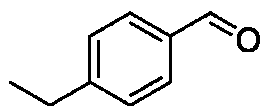
In vitro vizsgálatok III.: Apoptózis indukció a vízkoncentrátumok hígítási sorával

Az *in vitro* sejt kultúrában tartott humán lymphocytaegyszeri DMSO kezelése megnövelte az apoptotikus sejtek arányát. Ez a növekedés 50 µl/ml DMSO mennyiségnél volt szignifikáns és 100 µl/ml DMSO értéknél volt a legmagasabb. Mivel a kezeletlen víz-üledék és a fertőtlenítési melléktermékek is DMSO-ban lettek feloldva a további vizsgálatokhoz, a kapott apoptózis értékeket is csak akkor tekinthetjük szignifikánsnak, ha meghaladják a 100 µl/ml DMSO kezelésnél kapott értékeket, ill. ezeket is hasonló koncentrállóban alkalmazzuk. Ezt figyelembe véve mind 100 µl/ml CDBP kezelést követően, mint pedig 100 µl/ml CSRW kezelést követően az apoptotikus arány szignifikánsan magasabb volt, mint amit a DMSO kezelés önmagában képes volt kiváltani.

Eredményeink azt mutatják, hogy mind a nyers, tisztítatlan víz, mind a fertőtlenítésen átesett víztartalmaz olyan anyagokat, amelyek megfelelően magas koncentrállóban előidézhetik az apoptózis index emelkedését, *in vitro* humán perifériás lymphocyttákban.

Analitikai kémiai vizsgálatok: szerves mikroszennyezők azonosítása

A kémiai analízis alkalmával kapott eredmények alapján, a talált mintegy 200 organikus vegyületből kémiai struktúrájuk alapján kiválasztott 2 anyagot elemeztünk, mivel azok mutagén, apoptózist indukáló illetve carcinogén hatása feltételezhető. A két anyag: 2,4-difluoroanilin és a 4-etilbenzaldehyd.



A 4-etilbenzaldehydEBA (bal) és a 2,4-difluoroanilinDFA (jobb oldal) kémiai szerkezete

Comet test eredményei

A koncentrált víztisztítási melléktermékekkel és az EBA-val, illetve DFA-valvégzett Comet test vizsgálatok kvalitatív pozitív eredményt mutattak.

Apoptózis indukció a két kiválasztott vegyülettel: 2,4-difluoroanilin és a 4-etilbenzaldehyd

Kísérleteink során az alkalmazott dózisosok 1-200 mM-ig terjedtek a 2,4-difluoroanilin esetében, valamint 0,7-140 mM-ig az 4-etilbenzaldehyd esetében. Megállapítottuk, hogy 2,4-difluoroanilinnel kezelve a sejteket 10 mM felett a hatás már cytotoxikus. Apoptózist 1-10 mM dózistartományban észleltünk. 4-etilbenzaldehyddel kezelve a sejteket 7 mM felett a hatás már cytotoxikus, apoptózist a 0,7-7 mM dózistartományban észleltünk. Kontrollnak itt DMSO-t, egy szerves oldószert használtunk, miután az EB RPMI-ben nem oldódik. Az oldat minden mintában arányosan tartalmazott EB-t és DMSO-t.

In vivo vizsgálatok: Zebradánió toxicitás

Kórszövettani jellemzés

A kísérletkezdetétől számított 3 hét múlva szövettani elváltozásokat figyeztünk meg a vizsgált állatok májában, veséjében és kültakaróján. A magas-DBP koncentrációt tartalmazó vízben élő halaknál (10 mg/l EBA és 5 mg/l DFA), a megfigyelt elváltozások mértéke fokozatosan nőtt és a második hónapra érte el maximumát. Az alacsonyabb DBP koncentrációt tartalmazó vízben tartott állatoknál a megfigyelt koncentráció-függő elváltozások kevésbé voltak konzisztensek és nem mutattak időfüggést sem (2,5 mg/l DFA és 5 mg/l EBA).

EBA előidézte máj-elváltozások: a májparenchyma sejtek relatív zsírtartalmában és a zsírvakuólumok eloszlásában eltéréseket figyeztünk meg a kezelt és kontroll halak között. A kezelt állatokban azsírvakuólumok változatos méretűek és alakúak voltak a kísérletek teljes időtartamában a kontrollhoz képest, azonban a megfigyelés végpontjára a zsírcseppek kitöltötték a teljes májsejt-cytoplasmát, továbbá a kontroll állatok májsejtjeihez képest a sejtek glycogen tartalma csökkent. Ezeket a megfigyeléseket mind a hím, mind a nőstény állatokban megfigyeltük és hasonlóan találtuk. Nem találtunk azonban hepatocytamegalocytosisra, adenofibrosisra vagy egyéb hepatocelluláris elváltozásra utaló jelet.

EBA előidézte vese-elváltozások: A kezelt állatok disztálisvetesutubulusainak hámsejtjeiben Hematoxilin-eozin festés ill. PAS reakció alkalmazásával apró, PAS pozitív vakuólumok felhalmozódását figyeztünk meg. Piknotikuschromatin kondenzációt is megfigyeltünk ezen sejtek 5-10 százalékában. A

proximálistubulusokhámsejteiben ugyanakkor nagyobb méretű, szupranuclearisanelhelyeződő PAS pozitív cseppecskék voltak láthatóak, azonban a sejtmagokban nem találtunk elváltozást.

DFA előidézte máj-elváltozások: a teljes kísérleti időtartam alatt diffúz zsírosodás volt megfigyelhető a májsejtekben, jellemzően apró zsírvakuólumok megjelenése volt jellemző. A hepatocytákglycogen tartalma is jelentősen megnőtt a kontroll állatokhoz képest. Preneoplázia nem volt megfigyelhető, és nem tapasztaltunk különbséget a nemek között az elváltozások tekintetében.

DFA előidézte vese-elváltozások: az EBA vizsgálatok során már megfigyelt elváltozásokhoz hasonló kórszövettani képet tapasztaltunk.

Sem az EBA sem a DFA kezelt állatok szerveiben nem volt megfigyelhető amyloidcongo-vörösfestést alkalmazásával, továbbá nem figyeltünk meg pre-neopláziára vagy tumorra utaló elváltozásokat sem a különböző szervekben.

A víztisztítási melléktermékek májsejtek zsíros elfajulására gyakorolt hatásának kvantitatív vizsgálata

Alacsony EBA és DFA kezelés nem változtatta meg a zsírosodás mértékét szignifikánsan a májparenchymában ($P > 0.7$ EBA és $P > 0.4$ DFA). Ugyanakkor a két DBP magas koncentrációja már szignifikánsan megemelte a májsejtek zsírtartalmát.

A magasabb DBP koncentráció szignifikánsan megnövelte a zsírosodás mértékét a májsejtekben. A megfigyelt dózisfüggő májelváltozások a máj enzimszisztémák méregtelenítő aktivitásával magyarázható: feltehetően csak a magasabb koncentrációban alkalmazott DBP-k telítették az enzimszisztéma kapacitását, amely a megfigyelt zsírosodást eredményezte.

A halak viselkedési zavarai EBA és DFA kezelés során

A kezelések hatására fokozott reakciókészség (DFA), illetve renyhe reakció (EBA) volt észlelhető külső inger hatására.

AZ EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE

Kezeletlen és tisztított víz *in vitro* mutagenitásának vizsgálata AMES-teszttel

A különböző forrásokból származó vízminták lehetséges mutagenitását igen széles körben vizsgálták, és vizsgálják napjainkban is. Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy különböző eredetű ivóvíz (talajvíz, felszíni vizek) rendelkezhet mutagén aktivitással. Az ilyen vizsgálatok alapján feltételezhető, hogy a vízben található fertőtlenítési melléktermékeknek hasonlóan káros, mutagén, esetleg karcinogén hatása lehet az azt fogyasztó humán populációra is. Azonban ennek a lehetőségnek a pontos megítéléséhez, regionális ill. lokális feltérképezéséhez szükségszerűen meg kell vizsgálni az adott területről származó ivóvízmintákat. Az ivóvíz minták olyan vízműből származtak (Fővárosi Vízművek Rt. Csepeli Vízkezelőműben vett, dunaparton elhelyezkedő csápos kút), amely a tisztítási eljárás során a következő fő eljárásokat alkalmazta: a nyers víz levegőztetése, oxigénnel dúsítás; ózonozás, (előfertőtlenítés, oxidálás); permanganát adagolás (oxidálás); flokkulálás, gyors homok és aktív szén szűrés; klór adagolás (utófertőtlenítés). Vizsgálatainkban e folyamatok során képződött víztisztítási melléktermékeket és azok lehetséges káros hatásait vizsgáltuk.

Eredményeink szerint a Serdolit PAD III gyantaoszlopok segítségével nyert kezeletlen és a kezelt vízminták a TA-98 és a TA-100 Salmonella teszter törzseknél patkánymáj frakció hozzáadása nélkül negatív mutagén aktivitást indukálnak. Patkánymáj frakció jelenlétében azonban a tisztításon és fertőtlenítésen már átesett víz hatására a TA-100 teszter törzs pozitív mutagén aktivitást mutatott. A vízkezelési technológia folyamán a kezeletlen vízhez viszonyítva a kezelt víz revertáns baktériumszáma a TA-100 teszter törzsnél, aktiválás után, jelentősen emelkedett. Az Amberlite XAD-2 gyantaoszlop vízadszorbeátuma a TA-98 teszter törzsnél aktivitással és aktiválás nélkül is pozitív mutagenitást indukált. A TA-100 teszter törzs aktiválás nélkül a kezeletlen vízmintára negatív, a kezelt vízmintára pozitív mutagén aktivitással reagált.

Ezen vizsgálataink eredményei alapján arra következtethetünk, hogy a vízfertőtlenítéssorán keletkező melléktermékek az alkalmazott vízkezelési technológiával nem távolíthatók el az ivóvízből. Erre utal az Amberlite XAD-2 gyantaoszlop adszorbeátumának adagolására során megfigyelt pozitív, aktivitással és aktivitás nélkül is kiváltott mutagén aktivitás mindkét teszt törzsnél. Kiemelten fontos az is, hogy a kezelt víz Amberlite XAD-2 gyantaoszlop adszorbeátuma aktiválásra pozitív aktivitást eredményezett, amíg a kezeletlen víz adszorbeátuma negatív mutagén aktivitást indukált.

A lehetséges humán mutagén/karcinogén expozíció miatt mérlegelendő, hogy a pozitív mutagén eredményt hány liter víz adszorbeátuma idézte elő. Adataink szerint: 0,28-0,83 liter nyers vízből nyert szerves anyag indukált mutációt a lemezeken. A kezelt víz esetében ehhez 0,83-2,5 liter vízminta adszorbeátumra volt szükség, tehát a vízkezelés a vízmintában levő mutagén kapacitását csökkentette, de teljesen nem szüntette meg. A kezelt kútvíz a TA98 teszter törzsnél Amberlite XAD-2 gyantaoszlopon történt adszorpciót követően aktiválás nélkül, és aktiválással mutatott pozitív mutagenitást. Eredményeink szerint ez esetben is – a lineáris regresszó és a szoros korreláció alapján - pozitív mutagén aktivitás feltételezhető. A kezelt kútvíz a TA-100 teszter törzsnél az Amberlite XAD-2 gyantaoszlopon történt adszorpciót követően aktivitás nélkül, és aktiválással is mutagén hatást jelzett. A statisztikai vizsgálatok lineáris regressziót, szoros korrelációt mutatnak, amely egyértelműen pozitív mutagén

aktivitásra utal. Jelentős megfigyelés, hogy a kezelt, tisztított víz mutagén rátája mintegy háromszoros a kezeletlen vízéhez képest. Mindezek figyelembevételével mindenképpen szükséges a fertőtlenítés során keletkező melléktermékek mennyiségét kedvezőtlen egészségügyi hatásuk miatt csökkenteni.

Eredményeink figyelembevételével a következő ajánlásokat fogalmazhatjuk meg a hazai víztisztítási folyamatok során fellépő nem kívánt melléktermékek képződésének elkerülésére vonatkozóan: A szennyvíztisztítási technológia során a vízben található szerves anyagok eltávolítási hatásfokát mindenképpen célszerű lenne növelni, amely a létrehozott ivóvízbázisban nagymértékben csökkentené a szerves anyag-prekursorokszintjét, és ennek megfelelően a DBP-kcsökkenésével jár.

Továbbá ajánlatos lenne modern, kombinatív ivóvíztisztítási technológiák alkalmazását bevezetni, valamint megfontolandó az alternatív ivóvízfertőtlenítéstechnológiák alkalmazása is (pl. UV fény). Az alternatív kémiai ivóvízfertőtlenítési eljárásokban a fertőtlenítőszer adagjainak és a fertőtlenítési időtartam további optimalizálása lenne kívánatos, valamint elengedhetetlen az ivóvízfertőtlenítés hatásfokának folyamatos felügyelete annak érdekében, hogy az ivóvízfogyasztása biztonságos legyen, és kiváló minőségű ivóvíz álljon az azt fogyasztó humán populáció rendelkezésére.

Ivóvíz-tisztítási melléktermékek *in vitro*apoptózis indukáló képessége

Az víztisztítási melléktermékek mutagén illetve lehetséges karcinogén hatásáról számos tanulmány beszámolt. Ugyanakkor az irodalomban igen kevés adat található arra vonatkozóan, hogy ezek az egészségre többnyire bizonyítottan káros melléktermékek képesek-e apoptózist indukálni, vagy az apoptózis gyakoriságát befolyásolni. Vizsgálataink egyértelműen kimutatták, hogy a koncentrált vízminták nemcsak tisztítás után, de érdekes módon kezelést megelőzően is koncentráció-függő, szignifikáns apoptózis-indukáló hatással voltak a humán perifériás lymphocytákra. Kutatócsoportunk egy korábbi tanulmányában is hasonló, koncentráció-függő mutagén hatásról számolt be.

Ismert, hogy a sérült DNS-el rendelkező sejteket a szervezet képes apoptotikus folyamatok beindításával eliminálni, eltávolítani. Felvetődik a kérdés, hogy a megfigyelt mutagén ill. apoptózis indukáló hatást vajon ugyan azok a víztisztítási melléktermékek fejtik ki, vagy esetleg más-más anyagok felelősek a két folyamat kiváltásáért.

A tisztított víz esetleges karcinogén aktivitásának tanulmányozása során elengedhetetlen, hogy megvizsgáljuk az adott minták mutagén és apoptózis indukáló képességét is. Ezen vizsgálatok előre jelezhetik, hogy egy esetleges megnövekedett apoptotikusaktivitás hatékonyan meg tudja-e gátolni azon sejtek felhalmozódását, amelyek irreverzibilis DNS károsodást szenvedtek és fokozottan hajlamosak karcinogén aktivitásra.

A megnövekedett apoptotikus aktivitás olyan szöveti károsodást eredményezhet, melyek több, nem-daganatos megbetegedésre ie jellemzőek. A cardiovascularis- és idegrendszerben számos olyan elváltozás figyelhető meg, amelyek endothel-, myocardialis- vagy idegsejtek apoptózisával hozhatók összefüggésbe. Ezen elváltozások kialakulásában mindenképpen vizsgálni kellene a víztisztítási melléktermékek esetleges szerepét. Figyelemre méltó megfigyelésünk az is, hogy a nyers, kezeletlen vízből készített koncentrátumok is szignifikáns apoptózis indukáló hatással bírtak. Azt

azonban nem vizsgáltuk, és így adataink sem utalnak egyértelműen erre, hogy vajon ez utóbbi vízminta apoptózis indukáló hatása esetlegesen különböző eredetű bakteriális termékekkel vagy vizszennyezéssel függhet össze. Mivel azonban általában tisztított víz kerül fogyasztásra, ezért a további vizsgálatokban mindenképpen a víztisztítási melléktermékekre kell koncentrálni.

Víztisztítási melléktermékek vizsgálata *in vivo* zebradánió modellen

A fent részletezett *in vitro* vizsgálataink során kapott eredmények (Ames-teszt) azt mutatták, hogy a víztisztítás során kialakult melléktermékek koncentráció-függő mértékben fejtenek ki mutagén aktivitást, továbbá hasonló, szintén koncentráció-függő apoptózis indukáló hatást figyeltünk meg akkor, amikor ezeket a DBP-ethumán perifériás lymphocytákkalinkubáltuk együtt.

További, *in vivo* vizsgálataink során egy széles körben alkalmazott gerinces állatot, a zebradániót használtuk, hogy a két, víztisztítási melléktermékként már beazonosított molekula mutagén ill. esetleges karcinogén hatását megvizsgáljuk. A zebradániót napjainkban igen széles körben alkalmazzák toxicitási, ill. karcinogenezis indukciójának a vizsgálatára, továbbá fertőző megbetegedések és immunológiai vizsgálatok során is gyakran használják, mint model állatot.

Igen nagy előnye a zebradániónak, hogy nagyon gyorsan szaporodik, könnyű és olcsó a halakat fenntartani még igen nagy mennyiségben is. Kórszövettani vizsgálatokhoz is különösen jól használható, mivel a halak viszonylag kisméretűek (2-4 cm hosszúak), így relatív kevés metszetből viszonylag sok szerv tanulmányozható, és egy tárgylemezre igen sok metszet felhúzható egy állatból, meggyorsítva a szövettani analízist. Továbbá nem elhanyagolható az a tény sem, hogy a halak viszonylag átlátszóak, a pigmentált területek nem zavaróak, így nagyobb anatómiai elváltozások sztereomikroszkópos vizsgálatokkal minden további nélkül detektálhatóak.

Eredményeink szerint sem az EBA sem a DFA három hónapos kzelés alapján nem rendelkezik karcinogén hatással, nem indukáltak a megfigyelési időszak alatt preneopláziásléziókat a zebradániókban. Hosszabb ideig tartó inkubálás (1 év – több évig terjedő időszak) azonban elképzelhető, hogy már előidézhethet karcinogén aktivitásra utaló jeleket. Az értekezés megírásának időpontjában az ezirányú vizsgálatok folyamatban vannak. Az mindenestre biztosan állítható, hogy az általunk vizsgált víztisztítás során keletkező melléktermékek toxikusak a zebradániókra, elváltozásokat okoznak a májban, és a vesében mind idő- mind pedig koncentráció-függő módon.

További vizsgálatokra érdemes azon megfigyelésünk is, miszerint a kísérletek során alkalmazott anyagok befolyásolták a halak viselkedését és a külső stimulusokra adott reakcióikat is. Mivel a két anyag alkalmazása során jellemzően különböző viselkedésbeli változásokat produkáltak a halak, és egyértelműnek látszik az idegrendszer normál funkcióinak érintettsége, feltételezhető, hogy a két anyag idegrendszeri háttérmechanizmusokra gyakorolt hatása eltérő. Ez a megfigyelés különösen fontos lehet humán vonatkozásban is.

Mivel az ivóvíz tisztítása alapvető és kulcsfontosságú lépés számos akut- és hirtelen fellépő, esetenként halálos betegség kialakulásának megelőzéséhez, ezért további részletes vizsgálatok szükségesek ahhoz, hogy megelőzzük a víztisztítási melléktermékek kialakulását, vagy ha már kialakultak, akkor ezeket el tudjuk távolítani a vezetékes vízből. Ezen vizsgálatok alapvetően hozzájárulnának ahhoz, hogy lecsökkentsük a DBP-okoztanemkívánatos egészségkárosodást. Vizsgálataink és

eredményeink egyértelműen rámutattak arra, hogy nem elég az ivóvizet fertőtleníteni és megtisztítani, a biztonságos vízfogyasztás elengedhetetlen feltétele a tisztítási eljárások során keletkezett potenciálisan egészségkárosító melléktermékek eltávolítása is.

KÖVETKEZTETÉSEK

- Magyarországon elsőként mutattuk ki, hogy a tisztított ivóvíz tartalmaz a víztisztítás során keletkező melléktermékeket.
- A melléktermékeket tartalmazó anyagkeverék mutagén hatását állapítottuk meg Ames teszt segítségével.
- A humánlymphocytá tenyészetekben a melléktermékeket tartalmazó anyagkeverék apoptózist indukáló és fokozó hatással rendelkezik. Hasonló eredményt tudomásunk szerint az irodalomban nem közöltek.
- A víztisztítás során kialakuló melléktermékek kémiai analízise számos vegyület jelenlétét igazolta, ezen adatok alapján választottunk ki két vegyületet további vizsgálatokra.
- Mindkét kiválasztott molekulahumán perifériás lymphocytá tenyészetében apoptózis- indukáló és fokozó hatással rendelkezik.
- A két anyag zebra danio halakban végzett, három hónapos toxicitási tesztje daganatot, vagy daganat megelőző állapotot nem eredményezett, de máj és vese léziókat, illetve a halak viselkedési zavarait okozta.
- Az eddigi kísérleti eredmények indokoltá teszik a víztisztítási reakció melléktermékek biológiai hatására vonatkozó vizsgálatok folytatását és más anyagokra történő kiterjesztését is.

ÖSSZEFOGLALÁS

Az ivóvíz fertőtlenítése nyomán keletkezett melléktermékek (waterdisinfectionby-products-DBPs) feltételezett biológiai károsító hatását vizsgáltuk mutagén, apoptogén, toxicus, illetve carcinogén hatás szempontjából. Megállapítottuk, hogy

- Egy budapesti vízmű által előállított ivóvíz a nemzetközi szinten közölt értékeknek megfelelő mértékben kis mennyiségben tartalmaz DBP-t.
- A DBP koncentráció függően pozitív Amesteszteszt eredményezett két baktérium törzs esetében, mely mutagén hatásra utal.
- A DBP koncentráció függően apoptózist fokozó hatással rendelkező humán lymphocyták esetében. Hasonló eredményt az irodalomban tudomásunk szerint nem közöltek.
- A DBP-ben kollaboráló partnerünk több mint kétszáz kémiai jól meghatározható vegyületet mutatott ki, ezek közül a kémiai szerkezet alapján két, feltételezhetően mutagén vagy carcinogén vegyületet választottunk ki (2,4-difluoroanilint (DFA) és a 4-etil benzaldehyd (EBA)), és használtuk következő kísérleteinkben.
- Kimutattuk, hogy humán lymphocyták tenyésztésének dózis függően fokozott apoptózist mutattak mind DFA, mind EBA kezelés után.
- Zebradanio kísérleti akváriumi halak 3 hónapos kezelése DFA-val, illetve EBA-val máj, illetve a vese degeneratív elváltozásait eredményezte. Daganatra, vagy daganat megelőző állapotokra utaló jelek az alkalmazott dózisok nyomán három hónap alatt nem alakultak ki.
- A két vizsgált anyag egymással ellentétes irányú viselkedési zavart keltett a halpopulációban.
- A továbbiakban szükségesnek tartjuk a kezelési idő meghosszabbítása mellett a kísérleti halakon végzett vizsgálatok folytatását, DFA és EBA alkalmazásával.
- Eddigi kísérleti eredmények alapján megállapíthatjuk, hogy közegészségügyi szempontból fokozott figyelmet érdemelnek a vízfertőtlenítés során keletkezett mutagénnek, apoptózist fokozónak és toxicusnak bizonyult termékek. Az eddigiektől eltérő fertőtlenítő eljárások és a fertőtlenített víz további tisztítására irányuló technikai megoldások bevezetése eredményezhetné a fenti veszélyek mérséklését.

SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

Az értekezés témakörében megjelent közlemények

Rácz G, Csenki Z, Kovács R, Hegyi A, Baska F, Sujbert L, Zsákovics I, Kis R, Gustafson R, Urbányi B, Szende B. (2012) Subacute toxicity assessment of water disinfection by-products on zebra fish. *Pathol Oncol Res.* 18(3):579-84. (IF: 1,483)

Sujbert L, **Rácz G**, Szende B, Schröder HC, G Müller WE, Török G. (2006) Genotoxic potential of by-products in drinking water in relation to water disinfection: survey of pre-ozonated and post-chlorinated drinking water by Ames-test. *Toxicology* 219(1-3):106-12. (IF: 2,685)

Rácz G, Sujbert L, Bocsi J, Szende B. (2004) Rapid communication: water disinfection by-products enhanced apoptotic activity in human lymphocytes. *J Toxicol Environ Health A.* 10;67(17):1315-9. (IF: 1,548)

EGYÉB KÖZLEMÉNYEK

Tömböl Z, Eder K, Kovács A, Szabó PM, Kulka J, Likó I, Zalatnai A, **Rácz G**, Tóth M, Patócs A, Falus A, Rácz K, Igaz P. (2010) MicroRNA expression profiling in benign (sporadic and hereditary) and recurring adrenal pheochromocytomas. *Mod Pathol.* 23(12):1583-95. (IF: 4,176)

Szabó J, Végh A, **Rácz G**, Szende B. (2005) Immunohistochemical demonstration of gonadotropin-releasing hormone receptors in prostate carcinoma. *Urol Oncol.* 23(6):399-401 (IF: 1,067)

Szende B, Paku S, **Rácz G**, Kopper L. (2005) Effect of Fraxiparine and heparin on experimental tumor metastasis in mice. *Anticancer Res.* 25(4):2869-72. (IF: 1,604)

Kéri G, **Rácz G**, Magyar K, Orfi L, Horváth A, Schwab R, Hegymegi BB, Szende B. (2003) Pro-apoptotic and anti-apoptotic molecules affecting pathways of signal transduction. *Ann N Y Acad Sci.* 1010:109-12. (IF: 1,892)

Tyihák E, Bocsi J, Timár F, **Rácz G**, Szende B. (2001) Formaldehyde promotes and inhibits the proliferation of cultured tumour and endothelial cells. *Cell Prolif.* 34(3):135-41. (IF: 1,617)